

Untersuchung molekularer Mechanismen der NF- κ B/NRF (NF- κ B reprimierender Faktor)-Interaktion und ihre Rolle bei der Transkriptionsregulation

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.
genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Biologin
Myriam Bartels
geboren am 22.01.1977, in Hachmühlen

2007

Referentin: PD Dr. Mahtab Nourbakhsh
Institut für Pharmakologie der Medizinischen Hochschule
Hannover

Korreferent: Prof. Dr. Walter Müller
Institut für Biochemie/Physiologische Chemie der
Medizinischen Hochschule Hannover

Tag der Promotion: 08.12. 2006

Zusammenfassung

Die NF- κ B Transkriptionsfaktoren nehmen eine Schlüsselrolle in der Regulation des Immunsystems ein. Sie üben infolge spezifischer Stimuli eine aktivierende Wirkung auf die Gentranskription aus. Eine anhaltende Aktivierung von NF- κ B Proteinen kann nicht nur zu Störungen des Immunsystems führen, sondern auch zu Tumorzellproliferationen und fortschreitender Tumorentwicklung beitragen. Daher besteht ein großes Interesse an inhibitorischen Zielstrukturen, die eine unerwünschte Genaktivierung durch NF- κ B inhibieren können. Hierbei stellt der NF- κ B reprimierende Faktor (NRF) ein potentielles Ziel dar. Über direkte Protein-Protein-Interaktion mit NF- κ B inhibiert dieser Faktor die basale Transkription einiger Gene. Andererseits übt er nach Induktion mit dem Stimulus Interleukin (IL)-1 eine koaktivierende Wirkung auf den IL-8 Promotor aus. Vor diesem Hintergrund wurden während dieser Arbeit NRF spezifische Peptide als Modulatoren der NF- κ B vermittelten Transkriptionsaktivierung entwickelt und getestet. Ein Vorteil der Verwendung dieser Peptide ist die selektive Beeinflussung bestimmter Gene, die durch NF- κ B **und** NRF reguliert werden.

Ein grundlegendes Ziel der durchgeführten Arbeit war die Charakterisierung und funktionelle Analyse der Interaktion von NRF mit NF- κ B (p65). Darüber hinaus wurden weitere Faktoren der Transkriptionsinitiation sowie -elongation auf Bindung an NRF untersucht.

Um ein tiefergehendes Verständnis der Mechanismen der NRF regulierten Genexpression zu erhalten, wurde die TAP (von: Tandem affinity purification)-Fusionsproteinaufreinigung angewandt. Die im Rahmen der Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen, dass endogenes p65 und der negative Elongationsfaktor (NELF) an die Aminosäuren 204-308 von NRF gebunden vorliegen. Andererseits interagiert NRF mit der N-terminal lokalisierten Rel-Homologie-Domäne (RHD) auf p65. Die Interaktion von NRF mit p65 wurde durch zusätzliche Reporterexperimente bestätigt. Verglichen mit den Ergebnissen im unstimuliertem Zustand blieb die Bindungsspezifität und -effizienz von NRF an p65 nach Stimulation mit Newcastle Disease Virus (NDV) oder IL-1 konstant. Darüber hinaus konnte nach Induktion mit NDV und IL-1 kein signifikanter Effekt auf die Bindung von NRF an NELF festgestellt werden.

Für die Repression der NRF-p65-Interaktion wurden Peptide (16mere), die einen Bereich der minimalen Interaktionsdomäne von NRF wiedergaben (Aminosäure 204-

308), synthetisiert. Anschließend wurden sie auf ihr inhibitorisches Potential der Bindung mit endogenem, aufgereinigtem p65 getestet. Zwei spezifische Peptide, die die Aminosäuren 223-238 (B) und 282-297 (D) auf NRF umschlossen, wurden als Inhibitoren der Interaktion von NRF mit p65 *in vitro* identifiziert. Dieser Nachweis führte zu der Annahme, dass im Nukleus von Zellen die induzierte IL-8 Transkription nach Interkalation dieser Peptide in die NRF-p65-Bindung abnimmt. Eine solche Möglichkeit wurde durch Nukleofektionen untersucht. Anhand dieser Methode können synthetisierte Peptide direkt in den Zellkern lebender Zellen gelangen. Hierbei wurde eine bis zu 40 % reduzierte und IL-1 stimulierte Transkriptionsrate durch die Peptide B und D, hingegen nicht durch Kontrollpeptide, detektiert. Auf der anderen Seite konnte kein eindeutiger Effekt auf die virusinduzierte Expression von Interferon (IFN)- β festgestellt werden. Diese Resultate stimmten mit früheren Untersuchungen überein, wonach NRF nach Virusinfektion keine koaktivierende Funktion ausübte.

Basierend auf den während dieser Arbeit gewonnenen Resultaten wird ein hypothetisches Modell der Regulation NRF abhängiger Gene präsentiert.

Schlagwörter: NRF, NF- κ B, Transkriptionsregulation

Abstract

Members of NF- κ B transcription factor family play a key role in regulation of immune system. They transiently activate gene expression in response to specific stimuli and induction of signaling pathways. Persistent activation of NF- κ B transcription factors result in dysfunction of immune system and in tumor cell proliferation and progressive tumor development. Thus, there is great interest in inhibitory target molecules repressing unspecific activation of genes in response to NF- κ B factors. NF- κ B repressing factor (NRF) is a potential target. NRF inhibits basal transcription of several genes by direct protein-protein interaction with NF- κ B. Following induction with Interleukin (IL)-1, NRF exerts a coactivating effect on IL-8 promoter. The aim of this study was to design NRF specific peptides to modulate NF- κ B mediated transcription activation. An advantage of this approach is the selective modulation of NF- κ B and NRF regulated genes.

Initially, physical binding of NF- κ B (p65) to NRF was characterized. In addition, several transcription initiation and elongation factors were studied for interaction with NRF. Tandem affinity purification (TAP) was utilized to gain insights in molecular mechanisms of NRF action in transcriptional regulation. The results presented here show that endogenous p65 and the negative elongation factor (NELF) bind to amino acids 204-308 of NRF. On the other hand, NRF is able to bind to N-terminal domain of p65 named Rel-homology domain (RHD). NRF and p65 interaction was confirmed using reporter experiments. Following stimulation with Newcastle Disease Virus (NDV) or IL-1, binding specificity and efficiency of NRF to p65 remain constant compared to unstimulated state. Furthermore, NDV or IL-1 stimulations show no significant effect on interaction of NRF with NELF.

In order to inhibit NRF-p65 interaction, 16meric peptides corresponding to the minimal interaction domain of NRF (aa 204-308) were synthesized and tested for their capability to interfere with tandem affinity purified endogenous p65. Two specific peptides corresponding to amino acids 223-238 (B) and 282-297 (D) were identified inhibiting the interaction of NRF and p65 *in vitro*. This led to the proposal that these peptides might interfere with NRF-p65 interaction in the nucleus of living cells and decrease IL-8 transcription. This possibility was approved by nucleofection experiments which directly introduce synthetic peptides into the nucleus. In fact, peptides B and D, but not control peptides, are able to reduce IL-1 stimulated IL-8 gene

transcription up to 40 %. On the other hand, peptides B and D show no significant effect on NDV induced Interferon (IFN)- β gene expression. These results are in agreement with previous observations showing that NRF does not act as a coactivator in transcription stimulation by viral infection. Finally, the results of the presented study lead to a hypothetical model for NRF dependent gene regulation.

Keywords: NRF, NF- κ B, transcription regulation

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Transkription bei Eukaryonten	1
1.2. Regulation der Transkription auf Ebene der Chromatinstruktur	1
1.3. Transkriptionsinitiation	2
1.3.1. Regulatorische Elemente auf der DNA	2
1.3.2. Der Präinitiationskomplex (PIC)	4
1.3.3. Regulatorische Proteinkomplexe	5
1.3.4. Der Ablauf der Transkriptionsinitiation	7
1.3.5. Dirigierende Mechanismen der Transkriptionsinitiation bei Eukaryonten	8
1.4. Transkriptionselongation	9
1.4.1. Regulation der katalytischen Aktivität der RNA-Polymerase II über Elongationsfaktoren	10
1.5. Der Transkriptionsfaktor NF-κB	14
1.5.1 Aktivierung der NF- κ B Faktoren	16
1.5.2 Regulation der NF- κ B Faktoren	18
1.6. Der NF-κB reprimierende Faktor (NRF)	19
1.6.1. Regulation der transkriptionellen Aktivität der NF- κ B Faktoren durch NRF	20
1.6.2. Inhibition der basalen Aktivierung des IFN- β -Promotors durch NRF	21
1.6.3. Duale Funktion von NRF auf die Aktivierung des IL-8-Promotors und des HIV-1 LTRs	22
1.7. Ziel der Arbeit	24
2. Ergebnisse	26
2.1. Aufreinigung der NRF-TAP-Fusionsproteine	26
2.1.1. Tandem affinity purification (TAP)	26
2.1.2. Herstellung der NRF-TAP-Fusionsproteine	28
2.1.3. Nachweis der Expression der NRF-TAP-Fusionsproteine in HeLa-Zellen	31
2.2. Nachweis der NRF-NF-κB (p65)-Interaktion <i>in vivo</i>	32

2.2.1. Detektion der NRF-p65-Interaktion <i>in vivo</i> im nichtstimuliertem Zustand	32
2.2.2. Nachweis der NRF-p65-Interaktion <i>in vivo</i> nach IL-1-Stimulation	35
2.2.3. Nachweis der NRF-p65-Interaktion <i>in vivo</i> nach NDV-Stimulation	36
2.3. Untersuchung der Interaktion von NRF mit weiteren Komponenten der Transkriptionsmaschinerie	38
2.3.1. Untersuchung der NRF-p50-Interaktion <i>in vivo</i>	38
2.3.2. Untersuchung der Interaktion von NRF mit weiteren Komponenten <i>in vivo</i>	41
2.3.3. Interaktionsuntersuchungen von NRF mit Faktoren der Transkriptions-elongation <i>in vivo</i>	44
2.4. Eingrenzung der Interaktionsdomäne von NRF und NF-κB (p65) <i>in vivo</i>	47
2.4.1. Eingrenzung der Interaktionsdomäne auf NRF	47
2.4.2. Eingrenzung der Interaktionsdomäne auf NF- κ B (p65)	51
2.5. Inhibition der Interaktion von NRF mit NF-κB(p65) <i>in vitro</i>	55
2.5.1. Herstellung inhibitorischer Peptide	55
2.5.2. Nachweis der partiellen Inhibition der NRF-p65-Interaktion durch Peptide <i>in vitro</i>	57
2.6. Eingrenzung der DNA-Bindungsdomäne von NRF <i>in vivo</i>	59
2.6.1. Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)	60
2.6.2. Nachweis der Bindung von NRF(1-690)TAP an die Promotoren von IFN- β und IL-8 <i>in vivo</i>	61
2.6.3. Nachweis einer verstärkten Bindung von NRF(1-690)TAP an den Promotor von IFN- β nach Stimulation mit NDV <i>in vivo</i>	63
2.7. Untersuchung der von NRF und p65 abhängigen transkriptionellen Aktivität im Luziferase-Reportersystem	65
2.7.1. Gal-Lex-Luziferase-Reportersystem	65
2.7.2. Etablierung des Reportersystems	69
2.7.3. Nachweis der reprimierenden Wirkung von NRF auf die p65 vermittelte Transkription im Luziferase-Reportersystem	72
2.7.4. Untersuchung der reprimierenden Wirkung verschiedener GalNRF-Konstrukte im Luziferase-Reportersystem	74
2.7.5. Nachweis der inhibitorischen Wirkung des vollständigen NRF(1-690) unabhängig von der Gal4-Fusionsdomäne im Reporterexperiment	76

2.8. Modulation der Genexpression durch inhibitorische Peptide	78
2.8.1. Kerntransfer von synthetisierten Peptiden mittels Nukleofektion	79
2.8.2. Induktionskinetik der IL-8- und IFN- β -Genexpression	82
2.8.3. Nachweis der partiellen Inhibition der Genexpression von IL-8 nach Stimulation mit IL-1 durch synthetisierte Peptide	85
2.8.4. Untersuchung des Einflusses von inhibitorischen Peptiden auf die Gen- expression von IFN- β nach Stimulation mit NDV	93
3. Diskussion	98
3.1. Charakterisierung der Funktionsdomänen von NRF	98
3.1.1. Einsatz und Optimierung der TAP-Fusionsproteinaufreinigung	98
3.1.2. Charakterisierung und Eingrenzung der p65 bindenden Domäne des NRF auf 104 Aminosäuren	99
3.1.3. Detektion der Bindung der Rel-Homologie-Domäne (RHD) von p65 an NRF	100
3.1.4. Interaktion von NRF mit Faktoren der Transkriptionsinitiation	101
3.1.5. Interaktion von NRF an die Untereinheit E des negativen Elongations- faktors (NELF)	103
3.1.6. Nachweis der DNA-Bindung von NRF über die Aminosäuren 381-690	105
3.1.7. Nachweis der transkriptionellen Aktivität von NRF	106
3.1.8. Detektion der partiellen Inhibition der NRF-p65-Bindung durch für die minimale Interaktionsdomäne von NRF spezifischen Peptiden <i>in vitro</i>	107
3.1.9. Charakterisierung der Inhibition der induzierten Genexpression von IL-8 und IFN- β durch synthetisierte Peptide	111
3.2. Modellvorschlag der differentiellen Regulation NF-κB und NRF regulierter Gene	116
4. Material und Methoden	119
4.1. Materialien	119
4.1.1. Geräte	119
4.1.2. Verbrauchsmaterialien	120
4.1.3. Chemikalien	121
4.1.4. Allgemeine Puffer und Lösungen	123
4.1.5. Gebrauchsfertige Reagenzien und Kits	125
4.1.6. DNA- und Proteinstandards	126

4.1.7. Enzyme, Antikörper, Peptide, Cytokine und Viren -----	126
4.1.8. Nukleinsäuren-----	127
4.1.9. Kulturmedien und -agar -----	129
4.1.10. Zelllinien, Bakterienstämme und Plasmide -----	129
4.1.11. Software -----	130
4.1.12. Sonstiges-----	130
4.2. Methoden -----	131
4.2.1. Arbeiten mit HeLa-Zellen-----	131
4.2.2. Aufreinigung und Nachweis von Proteinen -----	136
4.2.3. Arbeiten mit Bakterien (<i>Escherichia coli</i>)-----	140
4.2.4. Arbeiten mit DNA und RNA-----	141
5. Literaturverzeichnis -----	149

Lebenslauf

Liste der Publikationen

Selbstständigkeitserklärung

Danksagung

Erklärung

Abkürzungsverzeichnis

% (w/v)	Percent weight/volume (Prozent Gewicht/Volumen): Prozentangabe; der Zahlenwert der Masse des eingewogenen Stoffes in g beträgt den angegebenen Prozentsatz des Volumens des Lösungsmittels
% (v/v)	Percent volume/volume (Prozent Volumen/Volumen): Prozentangabe; der Zahlenwert des Volumens des betreffenden Stoffes beträgt den angegebenen Prozentsatz des Volumens des Lösungsmittels
A	Adenin
Act	Kurzform für aktivierender Transkriptionsfaktor
AP-1	Aktivierendes Protein 1
APS	Ammoniumpersulfat
ATF-2	Aktivierender Transkriptionsfaktor 2
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
BAFF	B-Zell-aktivierender Faktor
C	Cytosin
ca.	circa
CBP	CREB-bindendes Protein
CDK	Cyclin abhängige Kinase (Cyclin dependent kinase)
CE	Capping enzyme
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
CMV	Cytomegalovirus
CTD	Carboxyterminale Domäne
CTP	Cytidintriphosphat
DBD	DNA-bindende Domäne
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
DPE	Downstream promotor element
DRB	5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenz- imidazole
DSIF	DRB sensitivitäts-induzierende Faktor
dNTP	Desoxynucleotid (ATP, CTP, TTP, GTP)
DTT	Dithiothreitol
E64	trans-Epoxy succinyl-L-Leucylamido-(4-Guanidino)-Butan
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
FCF	Fötales Kälberserum (fetal calf serum)
FITC	Fluorescein
ggf.	gegebenenfalls
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase

GRR	Glycin-reiche Region
GTF	Genereller Transkriptionsfaktor
GTP	Guanosintriphosphat
HAT	Histon-Acetyltransferase
HDAC	Histon-Deacetyltransferase
HEBS	HEPES-gepufferte Salzlösung (HEPES buffered saline)
HMG I(Y)	High mobility group protein I(Y)
hiNOS	Humane induzierbare NO-Synthase
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HIV	Humanes Immunodefizienzvirus
HSV	Herpes simplex Virus
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IGEPAL	(Octylphenoxy)polyethoxyethanol
IKK	I κ B-Kinase
INR	Initiatorelement
IL	Interleukin
kb	“Kilobase(n)”, 1000 bp
LB	Luria-Bertani
LTR	Long terminal repeat
LZ	Leucine zipper
MeCP	Methyl-CpG-binding protein
Med	Kurzform für Mediator
MPSV	Myeloproliferatives Sarkom-Virus
N	Beliebige Nukleinsäure
NBCAS	Nano+ Bio-Center Annotation Suite
NDV	Newcastle Disease Virus
NELF	Negative Elongationsfaktor
NEMO	NF- κ B essential modifier
NES	Kernexportsequenz
NF- κ B	Nuclear factor κ B
NIK	NF- κ B induzierende Kinase
NH	Negative regulatorische Domäne (HIV-1)
NLS	Kernlokalisationssequenz
NP40	Nonidet P40
NRD	Negativ regulatorische Domäne
NRE	NRF-bindendes DNA-Element (negative regulatory element)
NRF	NF- κ B reprimierender Faktor
OD _x	Optische Dichte bei x nm
p	Plasmid
P	Kurzform für phosphoryliert

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAP	Peroxidase Anti-Peroxidase
PCR	Polymerasekettenreaktion
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PIC	Präinitiationskomplex (preinitiation complex)
PMA	Phorbol Myristat Acetat
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
Pol	RNA-Polymerase
PP	Kurzform für hyperphosphoryliert
PRD	Positiv regulatorische Domäne
PSA	Androgen-responsive prostate-specific antigen
P-TEFb	Positiver Transkriptionelongationsfaktor b
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R	Purinbase
RAI	RelA-assoziiierter Inhibitor
RAP	RNA-Polymerase II-assoziierte Proteine
RBD	Rezeptorbindedomäne
Rem	Kurzform für Chromatin umordnende Komplexe
RHD	Rel-Homologie Domäne
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RT	Reverse Transkription
s.	siehe
s.o. / s.u.	siehe oben / siehe unten
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodiumdodecylsulfate)
SNIP	Smad nuclear interacting protein 1
SV-40	Simeon-Virus-40
T	Thymin
TAD	Transaktivierungsdomäne
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Elektrophoresepuffer
TAF	TBP-assoziiierter Faktor
TAP	Tandem affinity purification
TBP	TATA-Bindeprotein
TBS	Trisgepufferte Salzlösung (Tris buffered saline)
TBS-T	TBS-Tween
TEC	Transcription elongation complex (Transkriptionselongationskomplex)
TEMED	N, N, N', N'-Tetra-methyl-ethylendiamin
tetO	Tetracyclinoperator
tetR	Tetracyclinrepressor
TEV	Tobacco Etch Virus
TK	Thymidinkinase
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol

tTA	Tetracyclin kontrollierter Transaktivator
TTP	Thymidintriphosphat
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
u.a.	unter anderen
VP16	Virales Protein 16
Y	Pyrimidinbase
z.B.	zum Beispiel

Verwendete Einheiten, sofern sie nicht zu den SI-Basiseinheiten gehören:

°C	Grad Celsius, $x\text{ °C} = (x + 273,15)\text{ K}$
Da	Dalton, $1\text{ Da} = 1,66 \times 10^{-27}\text{ kg}$
g	Gramm, $1\text{ g} = 10^{-3}\text{ kg}$
g	Beschleunigung eines fallenden Körpers, $1\text{ g} = 9,81\text{ m/s}^2$
H	Hydrophobie; Maß für die Stärke der hydrophoben Eigenschaften der Seitenketten einzelner Aminosäuren
l	Liter, $1\text{ l} = 10^{-3}\text{ m}^3$
M	Molar, $1\text{ M} = 1\text{ mol/l} = 10^3\text{ mol/m}^3$
rpm	Rotationen pro Minute, $1\text{ rpm} = 1/60\text{ s}^{-1}$
V	Volt, $1\text{ V} = 1\text{ kg m}^2 / (\text{s}^3\text{ A})$
U	unit; Einheit für die Aktivität eines Enzyms; Definition je nach Enzym unterschiedlich
μ	Hydrophobe Moment; Maß für die strukturellen und chemischen Gegensätze innerhalb eines Moleküls

1. Einleitung

1.1. Transkription bei Eukaryonten

Das eukaryontische Genom ist mit einer durchschnittlichen Größe von drei Milliarden Basenpaaren sehr komplex und in einer kompakten Nukleoproteinstruktur, dem Chromatin, organisiert. Weniger als 2 % des Genoms kodieren für Proteine. Das entspricht einer Anzahl von ungefähr 35.000 Genen (Ilag *et al.*, 2002). Für eine adäquate Differenzierung und das Aufrechterhalten der Homeostase innerhalb der Zelle ist eine präzise Selektion und strikte Regulation von essentieller Bedeutung.

Hierfür wurden im Laufe der Evolution verschiedene Regulationsmechanismen ausgebildet. Neben dem posttranskriptionellen Prozessieren der RNA (differentielles RNA-Spleißen) zählen hierzu DNA-Neuanordnungen (Graveley, 2001; Agrawal *et al.*, 1998). Die primäre Regulation der Genexpression findet auf Ebene der Transkription statt. Hierbei werden die spezifischen DNA-Sequenzen durch Chromatin umordnende und modifizierende Prozesse freigelegt und anschließend in eine RNA-Struktur übersetzt. Die Transkription kann in drei zeitlich voneinander getrennten Phasen, der Initiation, Elongation und Termination, unterteilt werden. Für jeden dieser Abschnitte fungieren spezifische *cis*-regulatorische Sequenzen und spezialisierte Proteinkomplexe als Kontrollinstanzen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die regulatorische Funktion des NF- κ B reprimierenden Faktors (NRF) auf der Stufe der Rekrutierung zum Chromatin sowie auf der Ebene der Initiation und Elongation der Transkription untersucht. Aus diesem Grund wird in den folgenden Abschnitten näher auf transkriptionelle Initiations- und Elongationsprozesse eingegangen. Den Anfang bildet eine kurze Einführung in Chromatin umordnende Ereignisse.

1.2. Regulation der Transkription auf Ebene der Chromatinstruktur

Für die Transkriptionsinitiation ist es entscheidend, dass die entsprechende DNA für die basalen und regulatorischen Transkriptionsfaktoren zugänglich vorliegt. Hierfür werden die Nukleosomen, die aus Histonen als sich wiederholende Untereinheiten

des Chromatins aufgebaut sind, in ihrer Lage verändert. In Abhängigkeit von Adenosintri-phosphat (ATP) erfolgt dieses über Änderungen in der Struktur von Nukleosomen. Alternativ können Modifikationen im N-terminalen Bereich der Histone eingebracht werden. Hierbei handelt es sich um das Entfernen bzw. Einfügen von Phosphat-, Methyl- oder Acetyl-Gruppen (Strahl & Allis, 2000). Unter der ausschließlichen Berücksichtigung von elektrostatischen Erfordernissen wird vermutet, dass Histonacetylierungen und -phosphorylierungen durch das Einfügen negativer Polarität und Ladungen zu einer Dekondensation des Chromatins und somit zu einer Transkriptionsaktivierung führen. Histon-Acetyltransferasen (HATs) können somit als positive Regulatoren der Genexpression angesehen werden, während Histon-Deacetylasen (HDACs) eine Deacetylierung und folglich eine Repression der Transkription hervorrufen (Magnaghi-Jaulin *et al.*, 1998; Shestakova *et al.*, 2001). Laut der sogenannten Hypothese des „Histon-Kodes“ stellen bestimmte Muster der Modifikation der Histone ein Erkennungssignal für Chromatinumordnungs-komplexe dar (Jenuwein & Allis, 2001). Diese führen zu einer die Transkription begünstigenden bzw. reprimierenden Modulation in der Chromatinstruktur.

1.3. Transkriptionsinitiation

1.3.1. Regulatorische Elemente auf der DNA

Proteine, die für die Initiation und Regulation der Transkription essentiell sind, binden entlang der DNA-Sequenz an spezifische Bindestellen.

So interagiert der für die Transkriptionsinitiation unerlässliche Präinitiationskomplex (PIC) (s. 1.3.2.) an eine kurze Sequenz nahe des Transkriptionsstarts, dem minimalen Promotor (Villard, 2004). Den zuerst identifizierten minimalen Promotor stellt die TATA-Box dar (Breathnach & Chambon, 1981). Sie ist durch die Konsensussequenz TATAAA gekennzeichnet, die 25-30 Basenpaare (bp) in 5'-Richtung zum Transkriptionsstart lokalisiert ist (Smale & Kadonaga, 2003). Neben der TATA-Box wurden weitere minimale Promotorelemente, wie das Initiatorelement (INR) und das DPE (für: Downstream promotor element), beschrieben.

Das Initiatorelement weist die gleichen funktionellen Eigenschaften wie die TATA-Box auf und kann unabhängig von dieser fungieren (Smale & Baltimore, 1989; Smale *et al.*, 1998). Es ist an Position -2 bis +4 der Basenpaare relativ zu dem Trans-

kriptionsstart auf dem Promotor lokalisiert (Smale & Kadonaga, 2003). Aus Untersuchungen nach *in vitro* Transkriptionen sowie Datenbankanalysen geht hervor, dass das Element reich an Pyrimidinen ist (Javahery *et al.*, 1994; Bucher, 1990).

Das DPE ist evolutionär konserviert und wird häufig in Promotoren ohne TATA-Box gefunden (Kutach & Kadonaga, 2000). Es übt seine Funktion in Verbindung mit dem Initiatorelement aus, wobei die Sequenz von DPE +28 bis +32 relativ zu der Nukleotidbase Adenin an Position +1 des INR lokalisiert ist (Kutach & Kadonaga, 2000). Dabei wirken beide Elemente, INR und DPE, zusammen wie eine einzige Promotoreinheit. Das DPE kann nicht unabhängig von dem Initiatorelement agieren (Smale & Kadonaga, 2003).

Neben minimalen Promotorelementen sind *cis*-regulatorische DNA-Sequenzen für die Transkriptionskontrolle verantwortlich. Nach Bindung regulatorischer Proteine (Transkriptionsfaktoren) dienen sie der Aktivierung (Enhancer) bzw. Repression (Silencer) der Transkription. Diese Sequenzen können sich in unmittelbarer Nähe des Promotors befinden oder weiter in 5'- bzw. 3'-Richtung des Gens lokalisiert sein (Villard, 2004). Die bindenden Proteine werden entsprechend ihrer regulatorischen Funktion als Aktivatoren und Repressoren benannt.

Neben der Assoziation von regulatorischen Proteinen an die DNA sind weitere Proteine als Kofaktoren (Koaktivatoren/Korepressoren) bzw. Mediatoren an der Initiation und Repression der Genexpression beteiligt. Diese binden nicht direkt an spezifische Sequenzen, sondern an Transkriptionsfaktoren. Sie fungieren als Adaptoren zur Vermittlung der aktivierenden bzw. inhibierenden Signale zwischen den regulatorischen Proteinen, der RNA-Polymerase II sowie den generellen Transkriptionsfaktoren (s. 1.3.2.) am Promotor (Conaway *et al.*, 2005).

Dabei wird in 1.3.3. näher auf die Proteine, die regulierend auf die Genexpression wirken, eingegangen.

1.3.2. Der Präinitiationskomplex (PIC)

Die eukaryontische RNA-Synthese verläuft über mehrere Schritte. In einem ersten lagert sich ein Proteinkomplex, der als Präinitiationskomplex (PIC) bezeichnet wird, an den minimalen Promotor an.

Die Formierung des PIC ist hierbei unabdingbar für die über die RNA-Polymerase II (Pol II) ablaufende Genexpression. Sie umfasst, neben der Assoziation der Pol II, eine minimale Anzahl von evolutionär konservierten basalen oder generellen Transkriptionsfaktoren (GTFs). Diese sind TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIF und TFIIH.

In **Abb. 1.1.** ist ein schematischer Ablauf der Formierung des PIC an der TATA-Box dargestellt.

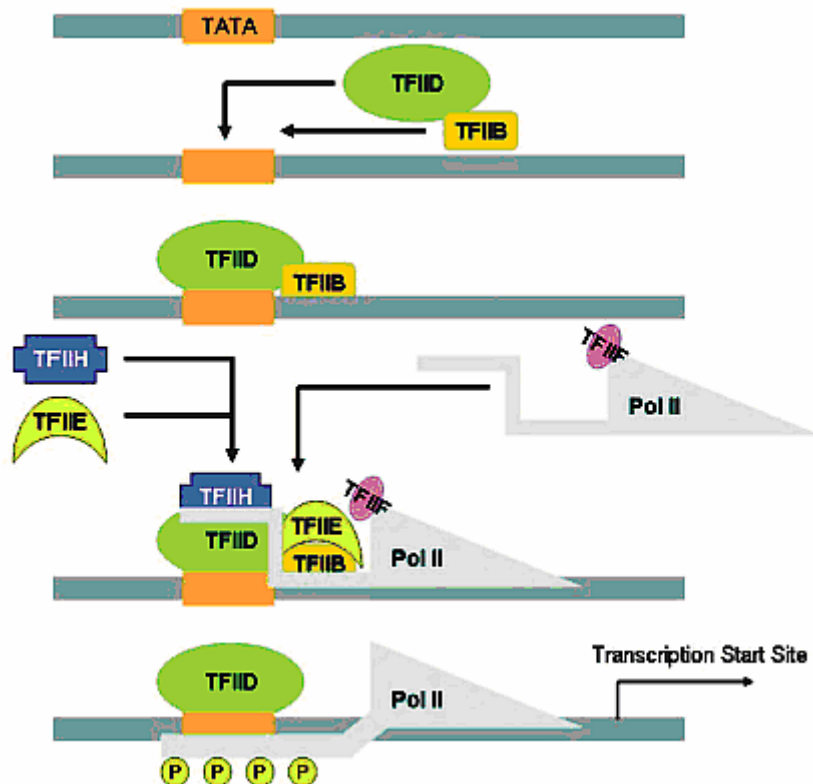


Abb. 1.1. Schematische Übersicht über die Formierung des PIC (Aus: Deutschman, 2005)

Hiernach bindet zunächst der Faktor TFIID an den minimalen Promotor. Dabei ist TFIID ein Komplex aus dem TATA-Bindeprotein (TBP) sowie TBP-assoziierten Faktoren (TAFs) (Levine & Tjian, 2003). Über TBP bindet TFIID an die TATA-Box, während die Assoziation an die alternativen Promotorabschnitte, INR oder DPE,

durch unterschiedliche TAFs erfolgt (Smale & Kadonaga, 2003). Nach Bindung von TFIID an die TATA-Box kommt es zu einer Anlagerung von TFIIB. Nach Deutschman (2005) liefert die kooperative Interaktion der beiden Faktoren ein Gerüst für die RNA-Polymerase II, die anhand von TFIIE, TFIIF und TFIIH an den minimalen Promotor eskortiert wird. TFIIH agiert als eine Kinase, die das Serin an Position 5 der carboxy-terminalen Domäne (CTD) der Pol II während der frühen Elongationsprozesse phosphoryliert (s. 1.4.). Hierbei könnte TFIIH eine wesentliche Komponente in der Verknüpfung zwischen Transkriptionsinitiation und -elongation darstellen. So geht aus Untersuchungen der Transkription des Humanen Immunodefizienzvirus (HIV) hervor, dass die Aktivierung der Transkriptionselongation über den Transkriptionsfaktor NF- κ B (s. 1.5.) durch Rekrutierung von TFIIH und anschließender Phosphorylierung der CTD der Pol II vermittelt werden könnte (Kim *et al.*, 2006).

Mittels Strukturanalysen konnte ein detaillierteres Bild der Bindung der GTFs an den minimalen Promotor erstellt werden (Boeger *et al.*, 2005). Nach Assoziation von TFIIB und TBP biegt TBP die TATA-Box um die C-terminale Domäne von TFIIB. Die N-terminale Domäne von TFIIB führt den Komplex aus TFIIB, TFIID und RNA-Polymerase II in eine, für die Transkriptionsinitiation optimale Position. Die nachfolgende Bindung von TFIIE an diesen Komplex resultiert in der Rekrutierung von TFIIH. Anhand einer ATPase/Helikase-Untereinheit von TFIIH wird die DNA verdreht. Nach Assoziation von TFIIF an einen DNA-Strang wird der Matrizen-Strang in die aktive Tasche der RNA-Polymerase II befördert. Nach der Synthese von mehr als zehn Ribonukleotiden kann die Freisetzung von TFIIB erfolgen, was wiederum in einer Fortführung der Transkription resultiert.

1.3.3. Regulatorische Proteinkomplexe

Wie in 1.3.1. bereits erwähnt, binden Transkriptionsfaktoren spezifisch an DNA-Sequenzen und fungieren als Aktivatoren bzw. Repressoren der Transkription.

Die meisten dieser Proteine enthalten eine α -Helix oder ein β -Faltblatt und weisen weitere Strukturen wie ein Helix-Turn-Helix-Motiv oder sogenannte Zinkfinger auf (Deutschman, 2005). Viele Transkriptionsfaktoren sind durch zwei Domänen gekennzeichnet. Über eine DNA-bindende Domäne lagern sie sich an *cis*-regulatorische Promotorelemente an. Anhand eines weiteren Bereichs interagieren diese Proteine

mit weiteren Transkriptionsfaktoren und bilden häufig Homo- bzw. Heterodimere aus. Dabei vermittelt diese Region vielfach die spezifische aktivierende bzw. reprimierende Funktion dieser jeweiligen regulatorischen Proteine.

Transkriptionsfaktoren, die eine herausragende Rolle als Aktivatoren der Genexpression einnehmen, sind die bereits erwähnten NF- κ B Faktoren. Ein weiteres Beispiel hierfür stellt das aktivierende Protein 1 (AP-1) dar, das als ein Homodimer aus Jun-Proteinen (c-Jun, JunB und JunD) bzw. als ein Heterodimer aus Jun- und Fos-Proteinen (c-Fos, FosB, Fra-1 und Fra-2) an die AP-1-Bindestelle vieler Promotoren bindet (Lu *et al.*, 2005).

Dagegen handelt es sich bei dem für die durchgeführten Arbeiten essentiellen Protein NF- κ B reprimierender Faktor (NRF) um einen die Genexpression inhibierenden Transkriptionsfaktor. Er fungiert in nicht stimulierten Zellen als Repressor der Transkriptionsinitiation (Nourbakhsh & Hauser, 1999; Nourbakhsh *et al.*, 2001) (s. 1.6.).

In der Literatur werden unterschiedliche Mediatoren in großer Vielfalt beschrieben (Roeder, 2005; Conaway *et al.*, 2005). Ein Beispiel für einen die Genexpression positiv regulierenden Kofaktor (Koaktivator) stellt das CREB-bindende Protein dar. Es bindet an den phosphorylierten Transkriptionsfaktor CREB, der nach Assoziation an das Enhancer-Element CRE (für: cAMP regulated enhancer) eine Transkriptionsaktivierung unterschiedlicher Gene bewirkt. Dieses erfolgt nach Interaktion von CBP über Vermittlung der Bindung des Komplexes an den generellen Transkriptionsfaktor TFIIB (Kwok *et al.*, 1994; Chrivia *et al.*, 1993).

Andererseits können Mediatoren als Repressoren der Genexpression fungieren. Als ein Mediator, der die Transkription negativ beeinflusst, gilt der Kofaktor mSin3A. Nach Methylierung von Promotor-Sequenzen bindet das Protein MeCP2 (für: Methyl-CpG-binding protein) an die DNA und interagiert mit dem Korepressor mSin3A. Diese Assoziation führt zu der Rekrutierung von Histon-Deacetylasen, welche an der Inhibition der Genexpression beteiligt sind (Tong *et al.*, 2005; Lewis *et al.*, 1992).

1.3.4. Der Ablauf der Transkriptionsinitiation

Die Transkriptionsinitiation in Eukaryonten erfolgt in mehreren Schritten von der Assoziation spezifischer Transkriptionsfaktoren und entsprechender Mediatoren bis zu der Ausbildung einer die Aktivierung der Genexpression vermittelnden Funktionseinheit. Dabei müssen mit Enhancer interagierende Proteine, die in einer Entfernung von mehr als 100 Kilobasen (kb) von dem durch sie reguliertem Gen liegen können (Levine & Tjian, 2003), an die GTFs des minimalen Promotors herangeführt werden. Dieser Prozess wird, wie bereits in 1.3.1. beschrieben, durch Kofaktoren vermittelt.

Ein vereinfachtes, schematisches Modell der einzelnen Schritte der Transkriptionsaktivierung ist in **Abb. 1.2.** wiedergegeben.

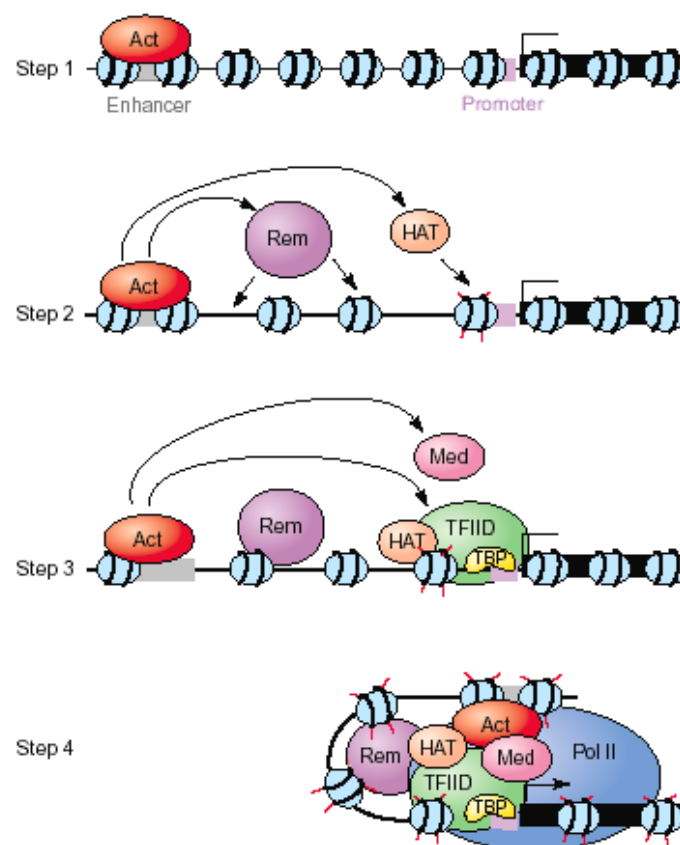


Abb. 1.2. Schematische Darstellung der Aktivierung der Genexpression in Eukaryonten (Aus: Szutorisz *et al.*, 2005)

Hiernach bindet in einem ersten Schritt ein aktivierender Transkriptionsfaktor (Act) an einen spezifischen Enhancer. Es wird vermutet, dass diese Assoziation zwei verschiedene Mechanismen beeinflusst. Zum Einen führt dies zu einer Verlagerung von

Nukleosomen über Chromatin umordnende Komplexe (Rem) und zu der Rekrutierung Histon modifizierender Proteine (z.B. HATs). Zum Anderen kommt es zu der Anlagerung der basalen Transkriptionsmaschinerie nach Interaktion des TATA-Bindeproteins (TBP) von TFIID an den minimalen Promotor. Die Assoziation spezifischer Mediatoren (Med) an die distal bindenden Transkriptionsfaktoren führt zu einer Verbindung der generellen Transkriptionsfaktoren mit den regulatorischen Proteinen. Der Präinitiationskomplex bleibt bis zu der räumlichen Zusammenführung der Promotorelemente mit den interagierenden Proteinen inaktiv. Dieses kann z.B. über eine Schleifenbildung (looping) des betreffenden DNA-Abschnittes oder durch Wanderung entlang des Promotors erfolgen (Szutorisz *et al.*, 2005).

Dieses Modell kann variiert werden. So wurde gezeigt, dass nach hormoneller Induktion sowohl die RNA-Polymerase II als auch die Histon-Acetyltransferasen unabhängig von dem minimalen Promotor zunächst an Enhancer-Elemente des PSA-Gens (für: androgen-responsive prostate-specific antigen) rekrutiert werden (Shang *et al.*, 2002; Louie *et al.*, 2003). Demzufolge können auch die GTFs an distale DNA-Sequenzen binden.

Für die Initiation der Transkription kann für einige Gene ein modifizierter Ablauf der Transkriptionsinitiation angenommen werden. Hiernach binden, nach Assoziation von aktivierenden Transkriptionsfaktoren an distale Enhancer, Chromatin modifizierende Proteine sowie basale Transkriptionsfaktoren an dasselbe Element. Die Anlagerung der Pol II an den Komplex kann die Initiation der Genexpression bewirken, was nachfolgend zu einer Umordnung der Chromatin modifizierenden Komplexe in Richtung zum Transkriptionsstart des Gens führt. Ein „looping“ der entsprechenden DNA-Sequenz resultiert letztlich in einer Assoziation der an den Enhancer bindenden Faktoren und zu einem Ablesen des Gens (Szutorisz *et al.*, 2005).

1.3.5. Dirigierende Mechanismen der Transkriptionsinitiation bei Eukaryonten

Neben der Kontrolle der Transkriptionsinitiation direkt über *cis*-regulatorische DNA-Sequenzen, kann die Transkriptionseffizienz durch dirigierende Mechanismen reguliert werden (Levine & Tjian, 2003).

Enhancer-Elemente können weit entfernt von dem durch sie kontrollierten Promotor liegen, so dass andere unabhängige Promotoren näher an sie lokalisiert sein können

(Merli *et al.*, 1996). Vor dem Hintergrund der Assoziation des „richtigen“ Enhancers mit dem „richtigen“ Promotor wurden drei Mechanismen beschrieben.

Für den ersten Fall, dass sich ein distal gelegener Enhancer und an ihn bindende Transkriptionsfaktoren zwischen zwei annähernd gleich weit entfernt lokalisierten Promotoren befindet, blockieren inaktive DNA-Bereiche die Interaktion mit einem dieser Promotoren (Kellum & Schedl, 1991). Es kann sich um 300-2000 bp lange Sequenzen handeln, die als Insulator-DNA bezeichnet werden. Diese enthalten häufig mehrere Bindestellen für große Proteine mit Zinkfinger-Motiven (Burgess-Beusse *et al.*, 2002).

Ein weiterer Mechanismus stellt die Direktion über GTFs dar, wonach diese mit unterschiedlichen Promotor-Elementen wie der TATA-Sequenz, dem INR sowie mit DPE interagieren können (s. 1.3.1.). Dabei scheinen zwischen zwei benachbarten Promotoren gelegene Enhancer vornehmlich TATA-Box enthaltene und andere Enhancer DPE regulierte Promotoren zu aktivieren (Butler & Kadonaga, 2001). Dieser als Genkompetition bezeichnete Mechanismus wurde zuerst im Globin-Lokus des Huhns entdeckt (Choi & Engel, 1988).

Aus dem letzten Modell geht hervor, dass Promotoren zudem über regulatorische Faktoren, die nahe des Promotors binden und Enhancer-Elemente kontrollieren, verfügen (Perkins *et al.*, 1996). Diese Faktoren fungieren nicht als Aktivatoren oder Repressoren der Transkription, sie dienen vielmehr der selektiven Rekrutierung spezifischer und distal gelegener Enhancer an Promotoren. Als ein Beispiel konnte dieses für das Protein Sp1 beschrieben werden (Su *et al.*, 1991).

1.4. Transkriptionselongation

Regulation findet nicht nur auf Ebene der Formierung des Präinitiationskomplexes (s. 1.3.2.) sowie der Initiation der Transkription, sondern auch während der Elongation des mRNA-Stranges statt. Dabei werden die einzelnen Schritte der Modifikation des Primärtranskripts, wie dem Anbringen der an dem 5'-Ende der RNA synthetisierten „Cap“-Struktur, der Stabilisierung und dem Export der RNA, über den assoziierten Transkriptionselongationskomplex (TEC) moduliert.

Vor der eigentlichen Elongation der Transkription wird der Präinitiationskomplex an dem minimalen Promotor demontiert (promotor clearance). Eine Untereinheit der

GTFs verbleibt jedoch als ein Gerüst für nachfolgende Transkriptionsstarts (Yudkovsky *et al.*, 2000). Bis zu einer Länge von 8-9 neusynthetisierten Ribonukleotiden ist die anfängliche Transkription instabil. Nach der Synthese von 23 Ribonukleotiden wird die Pol II stabilisiert und tritt in den Elongationsprozess ein (Pal & Luse, 2003). Wie bereits in 1.3.2 beschrieben und wie bei Bushnell *et al.* (2004) dargestellt, könnte dieses auf die Präsenz von TFIIB zurückgeführt werden. Durch das Lösen von TFIIB von der RNA-Polymerase II könnten sterische Hinderungen abgebaut und nachfolgend die Transkription fortgesetzt werden. Die Genexpression geht mit einer Phosphorylierung von Serinen an Position zwei und fünf (Ser 2, Ser 5) der carboxy-terminalen Domäne (CTD) der Pol II einher (Christmann & Dahmus, 1981). Während Ser 5 vornehmlich im Verlauf des frühen Elongationsprozesses phosphoryliert wird, kann ein Anstieg der Phosphorylierung von Ser 2 hauptsächlich zum Ende der Elongation beobachtet werden (Komarnitsky *et al.*, 2000).

1.4.1. Regulation der katalytischen Aktivität der RNA-Polymerase II über Elongationsfaktoren

Während der Elongation der Transkription kann die RNA-Polymerase II in ihrer Transkriptionsaktivität pausieren bzw. angehalten werden (Shilatifard *et al.*, 2003). Diese Mechanismen der Regulation der Elongation sind in **Abb. 1.3.** dargestellt.

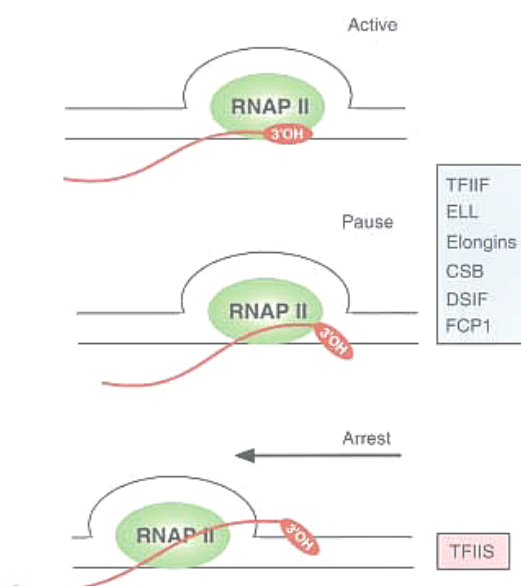


Abb. 1.3. Pausieren bzw. Arretieren der Aktivität der RNA-Polymerase II sowie Auflistung der wirkenden Elongationsfaktoren (Aus: Sims *et al.*, 2004)

Dabei handelt es sich bei einem kurzzeitigen Pausieren der Transkriptionselongation um eine selbstregulierte Unterbrechung der fortschreitenden Synthese des mRNA-Stranges. Bei Letzterem hingegen wird die Pol II in ihrer Transkriptionsaktivität irreversibel arretiert. Die Fortführung der Elongation erfolgt ausschließlich mit Hilfe spezifischer Faktoren. Sowohl die kurzfristige Unterbrechung als auch das Anhalten in der Synthese des RNA-Transkriptes wird über sogenannte Elongationsfaktoren reguliert. Hierbei handelt es sich um Proteine, die die Aktivität des TEC beeinflussen oder mit dem Komplex assoziiert sind (Sims *et al.*, 2004).

1.4.1.1. Pausieren der fortschreitenden RNA-Synthese

Zu den Faktoren, die modulierend in den Mechanismus des Pausierens der Pol II-Aktivität einwirken, gehören TFIIF, Komponenten der ELL-Familie, Elongins, CSB, DSIF und FCP1. Im Folgenden wird auf TFIIF, DSIF sowie mit dem Faktor funktionell assoziierte Komponenten näher eingegangen.

Bei TFIIF handelt es sich um einen Bestandteil des basalen Promotorkomplexes (s. 1.3.2.), der die Transkriptionsrate durch Unterdrückung des transienten Pausierens der Elongation stimuliert. Der heterodimere Faktor ist aus den RNA-Polymerase II-assoziierten Proteinen 30 und 74 (RAP30, RAP74) aufgebaut. Dabei wird TFIIF vornehmlich über Phosphorylierung der RAP74 Untereinheit reguliert und in seiner Aktivität bei der Initiation und Elongation modifiziert (Kitajima *et al.*, 1994). In diesem Zusammenhang kann eine selektive Phosphorylierung von RAP74 durch die Faktoren TFIID und TFIIH (Ohkuma & Roeder, 1994) bzw. über Autophosphorylierung erfolgen (Rossignol *et al.*, 1999).

Für den Gegenstand dieser Arbeit ist das Zusammenspiel der Komponenten DSIF, P-TEFb und NELF in der Regulation der Elongation von Bedeutung und wird nachfolgend näher beschrieben.

Der DRB sensitivitäts-induzierende Faktor (DSIF) wurde 1998 von Wada *et al.* als Komponente, die die Sensitivität für DRB (für: 5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazole) auf partiell aufgereinigte Transkriptionsreaktionen übertragen konnte, identifiziert. Dabei handelt es sich bei DRB um ein Nukleotid-Analogon, welches die Transkriptionselongation inhibiert. DSIF ist ein Heterodimer aus zwei Untereinheiten,

deren jeweiliges Molekulargewicht 160 kDa (p160) und 14 kDa (p14) beträgt. Dabei ist die cDNA von DSIF p160 homolog zu der des Transkriptionsfaktors Spt5 aus *Saccharomyces cerevisiae* und DSIF p14 ist funktionell gleichbedeutend mit Spt4 aus der Hefe (Wada *et al.*, 1998). Ursprünglich wurde angenommen, dass DSIF negativ auf die Elongation wirkt. Hingegen geht aus neueren Studien hervor, dass es sich bei DSIF vielmehr um einen positiven Elongationsfaktor handelt (Rondon *et al.*, 2004). Zudem wurde anhand der Transkription des HIV nachgewiesen, dass Spt5 in späte Elongationsprozesse eingreift und die Pol II vor einem Pausieren bzw. einer vorzeitigen Termination der Transkription bewahrt (Bourgeois *et al.*, 2002). Neben der Bindung an die Pol II interagiert DSIF mit TFIIF und mit dem für das Arretieren der Pol II wesentlichen Faktor TFIIS.

DRB bewirkt die Inhibition der Elongation durch Repression der Kinaseaktivität der CDK9 (für: Cyclin dependent kinase) des positiven Transkriptionelongationsfaktors b (P-TEFb). Die fortschreitende Elongation und die damit einhergehende Phosphorylierung von Serin 2 auf der CTD der Pol II und von DSIF wird so blockiert (Sims *et al.*, 2004). P-TEFb ist ein heterodimerer Komplex aus der Kinase CDK9 und Cyclin T (Peng *et al.*, 1998 a, b). Er gewährleistet eine Fortführung der Elongation nach dem DSIF/NELF vermittelten Pausieren der Pol II (Yamaguchi *et al.*, 1999).

Der negative Elongationsfaktor (NELF) fördert das transiente Anhalten der Elongation ausschließlich durch Assoziation mit DSIF (Yamaguchi *et al.*, 1999). Dabei bindet NELF an den Komplex aus RNA-Polymerase II und DSIF, jedoch nicht an die Pol II bzw. DSIF allein (Yamaguchi *et al.*, 2002). NELF ist aus fünf Untereinheiten, NELF-A bis NELF-E, aufgebaut, wobei die Untereinheit E ein RNA-Erkennungsmotiv enthält (Yamaguchi *et al.*, 2002). Diese Domäne ist essentiell für das über NELF vermittelte Pausieren der Pol II. Bei Narita *et al.* (2003) wurde darüber hinaus argumentiert, dass die Deletion dieser Untereinheit die Bindung an DSIF/Pol II stark schwächt und dass sie für die Assoziation an den Komplex wesentlich ist.

Das über DSIF/NELF regulierte Pausieren der Elongation gilt als Kontrollschritt für ein korrektes Aufsetzen der sogenannten „Cap“-Struktur am 5'-Ende der neu synthetisierten RNA. Dieser Prozess ist in **Abb. 1.4.** schematisch dargestellt.

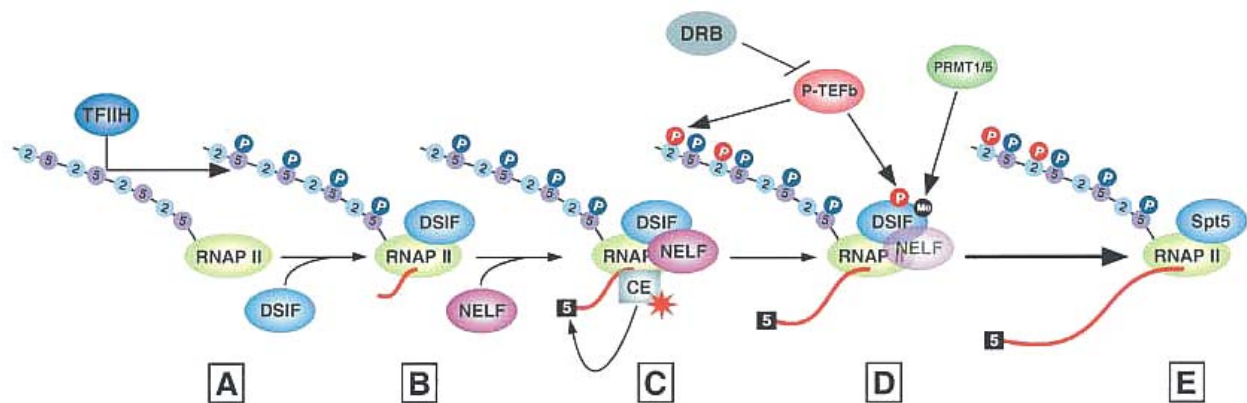


Abb. 1.4. Schematische Darstellung des DSIF/NELF vermittelten Pausierens der Elongation für die Gewährleistung der Synthese der 5'-'Cap'-Struktur (Aus: Sims et al., 2004)

Hiernach erfolgt die Phosphorylierung des Serins an Position 5 der carboxy-terminalen Domäne der neu synthetisierten RNA über TFIID (A). Kurz nach der Initiation bindet der Elongationsfaktor DSIF an die RNA-Polymerase II (B), was in einer Erkennung und Interaktion von NELF mit dem Komplex resultiert (C). Das nach Bildung dieses ternären Komplexes eingeleitete Pausieren der fortschreitenden Elongation ermöglicht die Assoziation von CE (für: capping enzyme) mit den Faktoren. Die Aktivität von CE wird sowohl von der carboxyterminalen Domäne der Pol II als auch der Untereinheit Spt5 von DSIF stimuliert. Die Phosphorylierung der CTD der Pol II an Serin 2 sowie von DSIF durch P-TEFb resultiert in einer Freisetzung von NELF und in einer weiterführenden Elongation (D,E). Zudem wird DSIF durch die Protein-Arginin Methyltransferase PRMT 1/5 methyliert. Während der fortgesetzten Elongation verbleibt die Untereinheit Spt5 von DSIF an der RNA-Polymerase II (E).

1.4.1.2. Arretieren der fortschreitenden RNA-Synthese

Das Arretieren der RNA-Synthese ist durch das Zurücksetzen der RNA-Polymerase entlang der DNA-Matrize gekennzeichnet. Dieses führt zu einer Fehlausrichtung der katalytisch aktiven Stelle auf der Pol II in Bezug auf das 3'-Ende der synthetisierten RNA (Sims et al., 2004). Dabei erfolgt ein Fortsetzen der Elongation nach Spaltung des Transkripts. Das hierbei ablaufende Durchscannen der RNA-Polymerase II entlang der RNA wird durch den Elongationsfaktor TFIIS (SII) gefördert (Fish & Kane,

2002; Conaway *et al.*, 2003). Dieser Faktor interagiert mit DSIF (Lindstrom *et al.*, 2003) und mit der RNA-Polymerase II (Kettenberger *et al.*, 2003). Nach Bindung von TFIIS und Wanderung des Proteins bis in die aktive Tasche durchläuft die Pol II strukturelle Veränderungen. Durch diesen Ablauf wird ein erneutes und optimales Einfügen der RNA in das aktive Zentrum der Pol II und ein Fortschreiten der Elongation bewirkt.

Neben den beschriebenen Elongationsfaktoren greifen weitere für die Umordnung des Chromatins verantwortliche Proteine in die Synthese des RNA-Stranges ein. Hierzu zählen der ATP-abhängige Chromatinumordnungs-komplex SWI/SNF (für: Homothalic switching deficient/sucrose nonfermenting), Histon Chaperone und der mit Nukleosomen interagierende Faktor Spt6 (Sims *et al.*, 2004). Da diese Komponenten für die hier vorliegende Arbeit nicht von entscheidender Bedeutung sind, wird auf sie nicht näher eingegangen.

1.5. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B

Bei der Gruppe der NF- κ B Transkriptionsfaktoren handelt es sich um strukturell verwandte und evolutionär konservierte Proteine, die zu der Rel-Familie gehören. Diese umfasst fünf NF- κ B Proteine: p65 (RelA), c-Rel, RelB, p50 (und sein Vorläufer p105) und p52 (und sein Vorläufer p100). Die Proteine liegen als Homo- und Heterodimere in der Zelle vor, wobei das Dimer p65/p50 das am weitesten verbreitete darstellt (Moynagh, 2005).

Allen gemein ist eine N-terminal gelegene und ungefähr 300 Aminosäuren umfassende Rel-Homologie-Domäne (RHD). Diese Region ist für die DNA-Bindung, Dimerisierung und den nukleären Transport verantwortlich (Hayden & Ghosh, 2004). Die beiden Vorläufer p105 und p100 sind zudem durch eine Glycin-reiche Region (GRR) gekennzeichnet. Bei p105 ist dieser Bereich für das Prozessieren zu p50 entscheidend, da die GRR als Terminationssignal für die Proteolyse dient (Lin & Ghosh, 1996; Orian *et al.*, 1999). Wie bei Heusch *et al.* (1999) beschrieben, ist die GRR auch für das Prozessieren von p100 zu p52 erforderlich. Darüber hinaus enthalten p100 und p105 C-terminal lokalisierte „Ankyrin repeats“. Diese Protein-Protein-Interaktionsmotive sind aus sich wiederholenden Modulen von näherungsweise 33

Aminosäuren aufgebaut. RelB ist durch einen N-terminalen Bereich, den „Leucine zipper“ (LZ) ausgezeichnet, der an der Transaktivierung beteiligt ist (Chen & Greene, 2004). Ausschließlich p65, c-Rel und RelB weisen zudem eine Transaktivierungsdomäne (TAD) am C-Terminus auf.

Eine schematische Übersicht über die einzelnen NF- κ B Faktoren ist in **Abb. 1.5.** zu sehen.

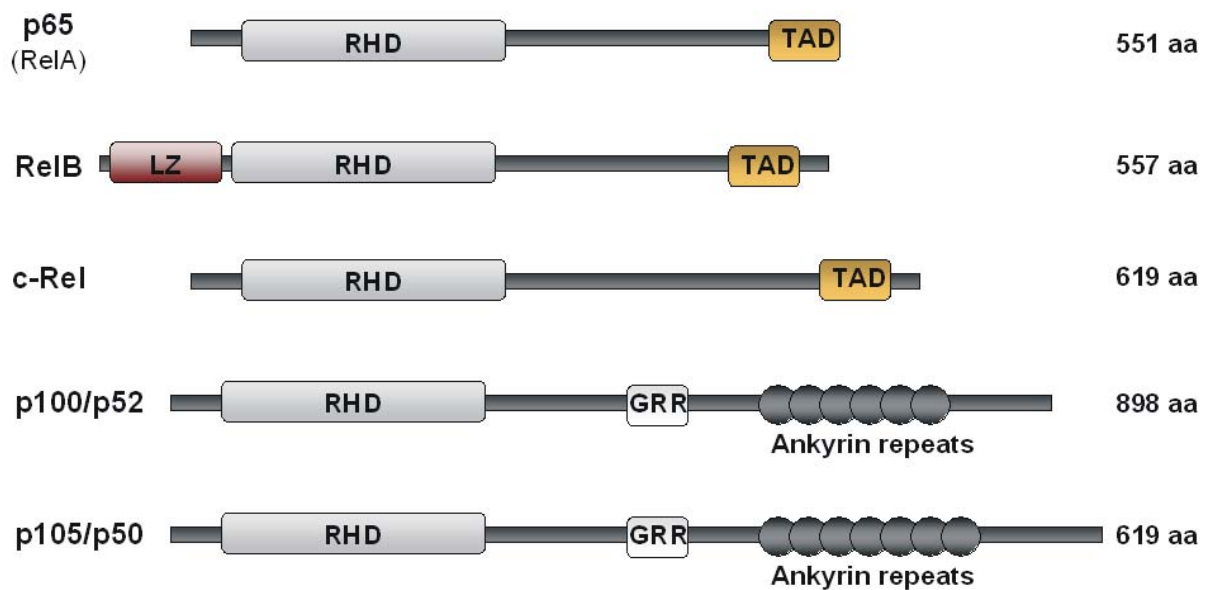


Abb. 1.5. Schematische Darstellung der NF- κ B Faktoren

Abbildung der einzelnen NF- κ B Proteine. Auf der rechten Seite der Darstellung ist die Anzahl der Aminosäuren der einzelnen Faktoren angegeben.

Die NF- κ B Proteine sind Transkriptionsfaktoren, die bei Säugern eine bedeutende Rolle in der Genregulation der Zellen des Immunsystems einnehmen. Sie sind an der Expression von Botenstoffen wie Chemokinen, Cytokinen und Wachstumsfaktoren beteiligt.

NF- κ B Proteine sind Aktivatoren der Transkription. Dennoch benötigen sie für die Aktivierung weitere Faktoren der Transkriptionsmaschinerie. Anhand der TAD von p65, RelB und c-Rel können die Proteine mit Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie interagieren. Hierzu zählen TBP (Xu *et al.*, 1993), TFIIB (Blair *et al.*, 1994) und der Kofaktor CBP (Perkins *et al.*, 1997). Die NF- κ B Faktoren p50 und p52 beinhalten zwar DNA-Bindedomänen, jedoch keine TADs. Infolgedessen können Homodimere von p50 und p52 als Repressoren der NF- κ B spezifischen Transkription fungieren (Ghosh *et al.*, 1998).

In **Tab. 1.1.** ist eine Auswahl NF- κ B regulierter Gene aufgeführt.

IL-8	Interleukin 8, Cytokin	Kunsch & Rosen, 1993
IFN- β	Interferon β , Cytokin	Hiscott <i>et al.</i> , 1989; Lenardo <i>et al.</i> , 1989
CD40	TNF-Rezeptor, Cytokinrezeptor	Hinz <i>et al.</i> , 2001
Androgenrezeptor	Hormonrezeptor	Zhang <i>et al.</i> , 2004
hiNOS	Humane induzierbare NO-Synthase	Morris <i>et al.</i> , 2003
Fas-Ligand	Apoptose-Induktor	Matsui <i>et al.</i> , 1998
HIV-1	Humanes Immundefizienzvirus	Nabel & Baltimore, 1987; Griffin <i>et al.</i> , 1989

Tab.1.1. Auswahl an NF- κ B regulierten Promotoren

1.5.1 Aktivierung der NF- κ B Faktoren

In den meisten Zellen liegt NF- κ B im Cytoplasma vor, wo es an Inhibitorproteine, die I κ Bs (Inhibitoren von NF- κ B), gebunden ist. Bei den I κ B Proteinen handelt es sich um eine Gruppe verwandter Faktoren. Hierzu zählen I κ B- α , I κ B- β , I κ B- γ , I κ B- ϵ , Bcl-3 und die Vorläuferproteine p100 und p105 (Hayden & Ghosh, 2004). Ihnen gemein sind die bereits erwähnten „Ankyrin repeats“. Hierüber können die I κ Bs an die für die Dimerisierung verantwortliche Domäne des NF- κ B Dimers binden (Hatada *et al.*, 1992)

Extrazelluläre Signale wie HIV-1 (Bachelerie *et al.*, 1991), der Tumornekrosefaktor (TNF)- α (Osborn *et al.*, 1989) oder Interleukin (IL)-1 (Kida *et al.*, 2005) induzieren eine Signalkaskade, die die nukleäre Konzentration der NF- κ B Dimere transient erhöht. Dabei wird in dem als klassischen Signalweg bezeichneten Prozess die Aktivierung von NF- κ B über Abbau von interagierenden I κ B gewährleistet.

Im Folgenden wird dieser Weg anhand des vornehmlich in Zellen vorkommenden p65/p50 Dimers beschrieben, welches im Cytoplasma gebunden an I κ B α lokalisiert ist. Der Ablauf ist in **Abb. 1.6.** schematisch wiedergegeben.

Eine Induktion führt zu der Freisetzung der NF- κ B Faktoren. Dieses erfolgt über Phosphorylierung von I κ B α durch spezialisierte I κ B Kinasen (IKK). Der IKK Komplex ist aus zwei Untereinheiten, IKK α (IKK1) und IKK β (IKK2), sowie der regulatorischen Einheit NEMO (für: NF- κ B essential modifier) aufgebaut (Rothwarf & Karin, 1999). Die Phosphorylierung von Serinen an Position 32 und 36 der I κ B α wird dabei durch IKK β gewährleistet. Das phosphorylierte I κ B α wird ubiquityliert und nachfolgend

degradiert. So wird die durch I κ B α maskierte Kernlokalisationssequenz (nuclear localization sequence, NLS) auf p65 freigesetzt. Anhand der NLS auf p65 und p50 und durch Abbau der Kernexportsequenz (nuclear export sequence, NES) der I κ B α verlagert sich das Gleichgewicht der Verteilung des NF- κ B Dimers in den Zellkern. Aufgrund des nicht maskierten NLS von p50 des p65/p50 Dimers liegen NF- κ B Faktoren auch in unstimulierten Zellen kernständig vor. Im Zusammenspiel mit den Kernexportsequenzen auf I κ B α kommt es zu einer Translokation der I κ B α /NF- κ B Komplexe zwischen Cytoplasma und Zellkern, wobei der Schwerpunkt der Lokalisation auf Seiten des Cytoplasmas liegt (Johnson *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2000).

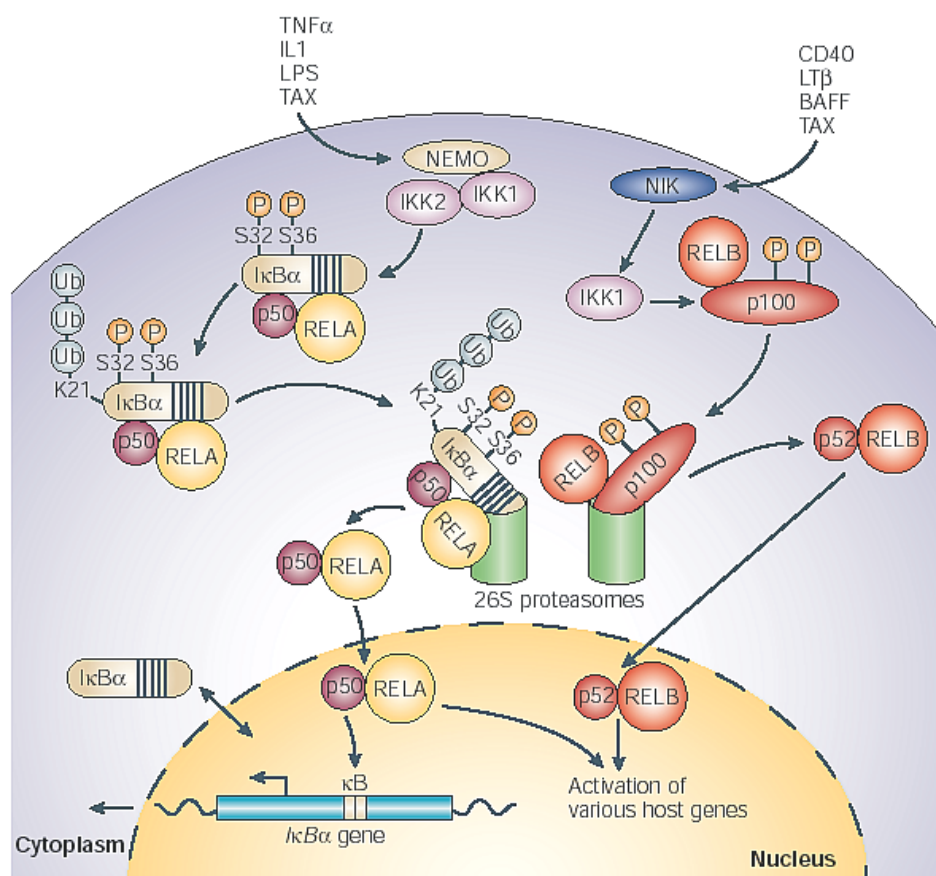


Abb. 1.6. Darstellung des schematischen Ablaufs der Aktivierung von NF- κ B mit und ohne Beteiligung der I κ Bs (Aus: Chen & Greene, 2004)

Im Zellkern bindet das p65/p50 Dimer an eine spezielle NF- κ B Konsensussequenz GGGRNYYYCC (R: Purinbase; Y: Pyrimidinbase; N: beliebige Nukleinsäure) ihrer Zielpromotoren (Chen & Greene, 2004). Die Bindung und die Rekrutierung weiterer Faktoren der Transkriptionsmaschinerie führt zu der Expression von Genen (s. **Tab.1.1.**). Zu diesen gehört ebenfalls I κ B α (Sun *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 1993). Die

resultierende *de novo* Synthese dieses Inhibitors führt zu einem Konzentrationsanstieg von I κ B α und hierdurch zu einem Export von NF- κ B Faktoren aus dem Zellkern in das Cytoplasma. Dieses wiederum könnte zu der Beendigung der über NF- κ B vermittelten Transkriptionsaktivierung beitragen (Arenzana-Seisdedos *et al.*, 1995; Arenzana-Seisdedos *et al.*, 1997).

In **Abb. 1.6.** ist zudem ein alternativer Signalweg der Aktivierung von NF- κ B Faktoren dargestellt. Dieser läuft unabhängig von I κ Bs ab. Hiernach kommt es nach Induktion der Zellen durch Stimuli wie den B-Zell-aktivierenden Faktor (BAFF) oder CD40 zu einer Aktivierung der NF- κ B induzierenden Kinase (NIK) und zu einer Phosphorylierung von p100 durch IKK α (Xiao *et al.*, 2001; Senftleben *et al.*, 2001). Nach Ubiquitylierung wird das Protein zu p52 prozessiert. Anschließend transloziert p52 vornehmlich in Assoziation mit RelB in den Zellkern, wo das Heterodimer spezifische Zielgene aktiviert (Claudio *et al.*, 2002).

1.5.2 Regulation der NF- κ B Faktoren

Neben der Lokalisationskontrolle der NF- κ B Faktoren mittels I κ Bs wird die Regulation auf vielen Ebenen gewährleistet. Hierzu zählen Modifikationen wie Phosphorylierungen und Acetylierungen in den NF- κ B Proteinen selbst. So führt die Phosphorylierung von p65 nach Translokation in den Zellkern zu einer verstärkten Bindung an den Kofaktor CBP. Daraus resultiert eine effizientere Verdrängung der die Transkription inhibierenden Histon-Deacetylasen (Vermeulen *et al.*, 2003; Zhong *et al.*, 2002). Nach einer durch Acetylierung der kernständigen NF- κ B Faktoren erzielten Modifikation wurde darüber hinaus eine verstärkte DNA-Bindung von p50 und eine erhöhte Transkriptionsaktivierung der heterodimeren NF- κ B Komplexe beobachtet (Furia *et al.*, 2002; Deng *et al.*, 2003).

Eine Inhibition der NF- κ B Aktivität auf unterschiedlichen Ebenen kann über DNA-Bindungscompetition, über Blockade des generellen Transkriptionsapparates oder durch direkte Protein-Protein-Interaktion ablaufen.

Ein Beispiel einer funktionellen DNA-Bindungsinterferenz stellt die zwischen dem Transkriptionsfaktor SP1 und NF- κ B dar (Hirano *et al.*, 1998). Es konnte gezeigt werden, dass Sp1 mit bestimmten Bindungssequenzen auf NF- κ B interagiert und dadurch die Anlagerung von NF- κ B verhindert. Sp1 ist ein konstitutiv aktivierender

Transkriptionsfaktor, der ein geringeres Aktivierungspotential aufweist als NF- κ B. Daher ist das Ergebnis dieser Konkurrenz eine reduzierte Transkriptionsaktivierung. Ein weiterer bekannter Fall ist die Blockierung der DNA-Bindungsdomäne von NF- κ B durch eine direkte Protein-Protein-Interaktion mit dem RelA assoziierten Inhibitor (RAI) (Takada *et al.*, 2002). Dies wurde am Beispiel des HIV-1 LTRs beschrieben. RAI ist ein im Zellkern lokalisiertes Protein, das durch eine direkte Interaktion an p65 bindet und seine Assoziation an den HIV-1 LTR verhindert. Die transkriptionelle Aktivität des HIV-1 LTRs wird durch dieses Protein stark eingeschränkt.

Eine Repression der NF- κ B abhängigen Genexpression kann auch über Blockade der basalen Transkription erfolgen. So kann das kernständige Protein SNIP1 (für: Smad nuclear interacting protein 1) an den Kofaktor CBP binden (Kim *et al.*, 2001). Durch diese Interaktion wird die Assoziation von CBP an NF- κ B blockiert und die Transaktivierung verhindert.

Ein wesentlicher Mechanismus der Inhibition der NF- κ B Aktivität erfolgt über Protein-Protein-Interaktion, die zum Beispiel über Glukokortikoid-Rezeptoren vermittelt wird (Dumont *et al.*, 1998). Diese nukleären Rezeptoren sind in der Lage, an die aktiven NF- κ B Komplexe zu binden und ihre transkriptionelle Aktivität zu reprimieren. Eine Assoziation der Glukokortikoid-Rezeptoren an die Promotorsequenzen ist dabei nicht notwendig. Eine weitere negative Interaktion mit NF- κ B ist am Beispiel der Promotoren von Interferon- β (IFN- β) und Interleukin-8 über Protein-Protein-Interaktion mit dem NF- κ B reprimierenden Faktor (NRF) nachgewiesen worden. Dabei war eine nähere Charakterisierung dieser Interaktion wesentlicher Bestandteil der hier vorliegenden Arbeit.

1.6. Der NF- κ B reprimierende Faktor (NRF)

Der Transkriptionsfaktor NRF wurde aufgrund seiner Bindung an den IFN- β -Promotor identifiziert (Nourbakhsh & Hauser, 1997). Bei dem Faktor handelt es sich um ein in allen bisher untersuchten Zellen konstitutiv exprimiertes und kernständiges Protein (Nourbakhsh & Hauser, 1999). Die genomische Sequenz des humanen und murinen NRF liegt in einem sehr konservierten Bereich auf dem X-Chromosom (Nourbakhsh *et al.*, 2000). NRF weist ein Molekulargewicht von 77,5 kDa auf und umfasst 690 Aminosäuren. Das Protein ist in seinem N-terminalen Bereich durch ein Kernlokali-

sationssignal (NLS) ausgezeichnet (Nourbakhsh & Hauser, 1999). Dieses umspannt die Aminosäuren 30-46 des Proteins. Durch Reporterexperimente mit einem C-terminal verkürzten NRF-Konstrukt wurde eine DNA-bindende Domäne (DBD) in dem Bereich von Aminosäure 296-388 auf NRF definiert (Nourbakhsh & Hauser, 1999). Zudem wurden in der carboxyterminalen Region mittels computergestützter Analysen Bindestellen für einzel- und doppelsträngige Nukleinsäuren identifiziert (Niedick *et al.*, 2004).

1.6.1. Regulation der transkriptionellen Aktivität der NF- κ B Faktoren durch NRF

NRF interagiert als Transkriptionsfaktor mit Zielpromotoren. Die Bindung an die DNA-Sequenz erfolgt dabei über ein NRF-bindendes DNA-Element (negative regulatory element, NRE) mit der Konsensussequenz AATTCCTCTGA (Nourbakhsh *et al.*, 2000).

Eine Auswahl von NRE enthaltenen Promotoren ist in **Tab. 1.2.** zusammengestellt.

NF- κ B regulierte Promotoren	NRF Erkennungssequenz	NRF-Bindung <i>in vitro</i>
IFN- β (-60/-50)	AATTCCTCTGA	+
IL-8 (-1415/-1405)	ATTCCTCTGA	+
HIV-1 LTR (-174/-164)	ACTTCC*CTGA	+
HIV-1 LTR (-394/-385)	AATTCATCACA	+
HTLV-1 LTR (-134/-124)	AATTCCTCCCA	+
iNOS (-6749/-6739)	AATTCCTCAGC	+
IL2R α (-394/-384)	CCTTCATCCCA	+
ELAM-1 (-91/-80)	ATTCCTCTTT	Nicht getestet
NCAM-1 (-872/-817)	AATTCCTTCT	+

Tab. 1.2. Auswahl von identifizierten Zielpromotoren von NRF

Neben dem identifizierten NRE enthalten alle aufgelisteten Promotoren eine Erkennungssequenz für NF- κ B. In Klammern ist die Entfernung der Bindungssequenz von NRF zum Transkriptionsstartpunkt in Basenpaaren angegeben. Mit Ausnahme der Promotoren von IL-8 und IFN- β liegen die Bindungsstellen für NRF und NF- κ B in allen anderen Promotoren bis zu 300 Basenpaare auseinander.

Die in der **Tab. 1.2.** aufgeführten Promotoren enthalten neben einem NRE eine zusätzliche Bindestelle für NF- κ B Faktoren. Im basalen Zustand übt NRF eine negativ regulatorische Wirkung auf bindende NF- κ B Proteine aus. Dieses wurde beispielsweise für den Promotor der NO-Synthase bestätigt (Feng *et al.*, 2002). Dabei ist dieser Effekt unabhängig von der Distanz und Orientierung des NRE (Nourbakhsh *et al.*, 1993), jedoch spezifisch für NF- κ B (Nourbakhsh & Hauser,

1999). Zudem geht aus Reporterexperimenten hervor, dass das Repressionspotential von NRF zu unterschiedlichen NF- κ B Dimeren unterschiedlich ist (Nourbakhsh & Hauser, 1999). Während NRF überexprimierte p65/c-Rel Dimere 40fach inhibieren konnte, wurde an Dimeren wie p65/p65 eine schwache fünffache Inhibierbarkeit durch NRF detektiert. Dabei wurde an bakteriell exprimiertem NRF *in vitro* nachgewiesen, dass das Protein NF- κ B Faktoren direkt bindet (Nourbakhsh & Hauser, 1999).

1.6.2. Inhibition der basalen Aktivierung des IFN- β -Promotors durch NRF

Das IFN- β -Gen ist ein konstitutiv inaktives Gen, welches spezifisch durch eine virale Infektion induziert werden kann. Der Promotor enthält vier positiv regulatorische Domänen (PRDI-IV). Diese Domänen werden durch aktivierende Transkriptionsfaktoren wie Interferon regulatorische Faktoren (IRFs), dem Heterodimer aus c-Jun und dem aktivierenden Transkriptionsfaktor 2 (ATF-2) sowie NF- κ B erkannt (Thanos & Maniatis, 1995b). Zusammen mit dem HMGI(Y) Protein (für: High mobility group protein I(Y)) bilden diese mit dem Promotor interagierenden Proteine einen Multiproteinkomplex, das „Enhanceosome“ (Munshi *et al.*, 2001). Nach Formierung des Komplexes kommt es zu einer Rekrutierung von Chromatin modifizierenden Faktoren, die durch Acetylierungen die TATA-Box sowie den Transkriptionsstart freilegen (Agalioti *et al.*, 2000). Wesentliche Komponenten dieser Modifizierungen sind das CREB-bindende Protein und p300/CBP-assoziierte Faktoren. Diese Komponenten weisen Histon-Acetyltransferase (HAT)-Aktivität auf (Munshi *et al.*, 2001). Nach der Umordnung und Freilegung des minimalen Promotors kommt es zu einer Anlagerung der generellen Transkriptionsfaktoren (s. 1.3.2.), welche die Genexpression von IFN- β initiieren (Agalioti *et al.*, 2000).

Die konstitutive Repression des Promotors erfolgt über eine negativ regulatorische Domäne (negative regulatory domain; NRD) (Goodbourn & Maniatis, 1988). Innerhalb dieser Domäne wurde ein negativ regulatorisches Element (NRE) entdeckt (Nourbakhsh *et al.*, 1993). Es konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor NRF an dieses Element bindet (Nourbakhsh & Hauser, 1999).

Eine schematische Übersicht der regulatorischen Domänen entlang des IFN- β -Promotors ist in **Abb. 1.7.** zu sehen.

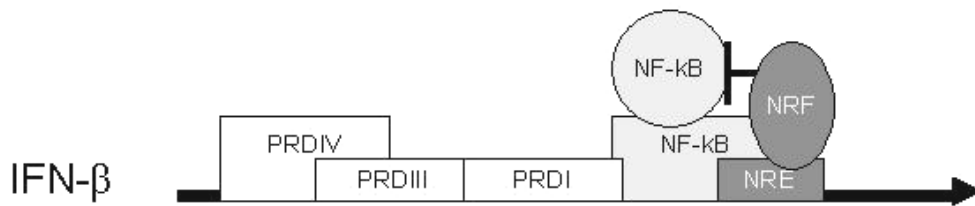


Abb. 1.7. Darstellung der regulatorischen Domänen des IFN- β -Promotors

Entlang des Promotors befinden sich vier positiv regulatorische Domänen (PRDs), an die Transkriptionsfaktoren binden. NF- κ B interagiert mit PRDI. Innerhalb der negativ regulatorischen Domäne (NRD) ist ein NRE enthalten, an das NRF bindet.

Durch eine direkte Protein-Protein-Interaktion mit NF- κ B inhibiert NRF die Transkription von IFN- β im unstimuliertem Zustand (Nourbakhsh & Hauser, 1999).

So resultierte eine Reduktion des endogenen NRF Proteins über NRF-Antisense in einer basalen Aktivierung des IFN- β -Promotors (Nourbakhsh & Hauser, 1999). Nach Virusinduktion übte eine Veränderung der endogenen Konzentration von NRF keinen Einfluss auf die Genexpression von IFN- β aus (Nourbakhsh & Hauser, 1999). Diese Beobachtungen stimmen mit vorhergegangenen Versuchen überein, wonach die Deletion des NRE keinen Effekt auf die Induzierbarkeit des IFN- β -Promotors verursachte (Nourbakhsh *et al.*, 1993).

1.6.3. Duale Funktion von NRF auf die Aktivierung des IL-8-Promotors und des HIV-1 LTRs

Wie IFN- β ist auch das Gen für das sekretorische Chemokin IL-8 auf transkriptioneller Ebene strikt reguliert und konstitutiv inaktiv. Neben Bindungsstellen für positiv regulatorische Transkriptionsfaktoren wie den aktivierenden Transkriptionsfaktor AP-1, C/EBP und NF- κ B enthält der Promotor auch ein NRE (Nourbakhsh *et al.*, 2001). Dabei sind die Bindungssequenzen bis auf ein Basenpaar für die Promotoren von IL-8 und IFN- β identisch.

Eine schematische Darstellung der einzelnen regulatorischen Domänen entlang des IL-8-Promotors liefert **Abb. 1.8**.



Abb. 1.8. Schematische Übersicht von Bindungsstellen des IL-8-Promotors

Der IL-8-Promotor beinhaltet positiv regulatorische Domänen für aktivierende Transkriptionsfaktoren wie AP-1, C/EBP und NF- κ B und verfügt über ein NRE, an das NRF bindet. Entsprechend IFN- β erfolgt auch für IL-8 eine Repression der basalen Aktivität von NF- κ B durch NRF über direkte Protein-Protein-Interaktion.

NRF inhibiert die basale Aktivität des Promotors über eine direkte Protein-Protein-Interaktion mit NF- κ B. So führte die Abnahme der endogenen Konzentration von NRF durch NRF-Antisense zu einem basalen Anstieg der Expression des IL-8-Gens (Nourbakhsh *et al.*, 2001).

IL-8 kann neben viralen Stimuli auch durch IL-1 und TNF- α induziert werden (Kasahara *et al.*, 1993; Brasier *et al.*, 1998). Entsprechend der Situation am IFN- β -Promotor übt NRF keinen Einfluss auf die IL-8-Genexpression nach Virusinduktion aus. Nach Stimulation mit IL-1 wirkt das Protein jedoch induzierend. Dementsprechend nahm die IL-1 aktivierte Transkription von IL-8 durch Verringerung der endogenen NRF-Konzentration durch NRF-Antisense ab (Nourbakhsh *et al.*, 2001). Aus diesen Versuchen kann geschlossen werden, dass NRF eine duale Funktion auf den IL-8-Promotor ausübt. Während er die Genexpression in unstimulierten Zellen hemmt, wirkt das Protein nach Stimulation mit IL-1 koaktivierend.

Darüber hinaus wurde eine duale Funktion von NRF am LTR (für: Long terminal repeat) des Humanen Immunodefizienzvirus Typ I nachgewiesen (Dreikhausen *et al.*, 2005).

Das HIV-1 ist ein humanes Retrovirus, dessen RNA-Genom nach Infektion und reverser Transkription in eine cDNA umgeschrieben und als Provirus in das Wirtsgenom integriert wird (Wu, 2004). Nach Induktion wie der Verabreichung des Stimulus Phorbol Myristat Acetat (PMA) wird die Transkription der viralen Gene eingeleitet. Dabei dient das integrierte Provirus als Vorlage (Nisole & Saib, 2004). Die Regulation der Expression erfolgt dabei über eine Domäne in dem viralen LTR, an die verschiedene zelluläre Transkriptionsfaktoren binden (Dreikhausen *et al.*,

2005). Innerhalb dieser Domäne wurden NF- κ B Bindestellen identifiziert, die bei der Aktivierung des Provirus eine bedeutende Rolle spielen (Muthumani *et al.*, 2003).

Im HIV-1 LTR wurde eine negative regulatorische Domäne (NH) definiert, an die NRF bindet (Dreikhausen *et al.*, 2005). Während NRF nach Stimulation für die Aktivierung der Transkription des HIV-1 LTR erforderlich ist, reprimiert das Protein die Aktivität des Promotors in unstimulierten Zellen. Diese Regulation erfolgt auf Ebene der Transkriptionselongation. Dabei wird die Rekrutierung des Elongationsfaktors DSIF und der Formierung nachfolgender Elongationskomplexe durch die hyperphosphorylierte RNA-Polymerase II verhindert (Dreikhausen *et al.*, 2005).

1.7. Ziel der Arbeit

Als ein erstes Ziel dieser Arbeit soll die NRF-NF- κ B-Interaktion *in vivo* detektiert und die Interaktionsdomäne auf NF- κ B und NRF näher eingegrenzt werden. Hierfür wird die Methode der TAP-Fusionsproteinaufreinigung (von: Tandem affinity purification) eingesetzt. Eine nähere Definition der minimalen Bindungsdomäne soll schrittweise über C-terminal verkürzte NRF-Sequenzen erfolgen.

Weiterführend sollen, auf Grundlage einer identifizierten minimalen Interaktionsdomäne, NRF spezifische Peptide synthetisiert und diese mit Hilfe der TAP-Fusionsproteinaufreinigung *in vitro* auf Funktionalität überprüft werden. Die Ermittlung des Einflusses dieser Peptide auf die Expression NRF und NF- κ B regulierter Gene soll nachfolgend am Beispiel von IFN- β und IL-8 erfolgen. Mittels Elektroporation sollen die synthetisierten Peptide in den Nukleus stimulierter Zellen überführt und die Transkriptionsaktivität quantitativ über die Menge von spezifisch amplifizierten cDNA-Fragmenten ermittelt werden.

Ein zweites Ziel dieser Arbeit soll einem tieferen Verständnis der Mechanismen der NRF abhängigen Regulation von Zielpromotoren dienen. Hierzu soll die TAP-Fusionsproteinaufreinigung für die Identifikation weiterer, mit NRF interagierender Komponenten der Transkriptionsinitiation und -elongation herangezogen werden. Diese Erkenntnisse sollen als Basis für die Erstellung eines vorläufigen und hypothetischen Modells dienen.

Das Hauptziel dieser Arbeit ist die Entwicklung NRF spezifischer Peptide, die in die Interaktion des Proteins mit NF- κ B eingreifen können. Anhand dieser Modulatoren könnte die Transkriptionsaktivierung NF- κ B regulierter Gene inhibiert und das Expressionsmuster inflammatorischer Gene modifiziert werden. Der Vorteil dieses Systems wäre die spezifische und ausschließliche Beeinflussung NF- κ B **und** NRF regulierter Gene.

2. Ergebnisse

2.1. Aufreinigung der NRF-TAP-Fusionsproteine

Als kernständiges Protein bindet NRF an verschiedene Zielpromotoren (s. 1.6.1.) und interagiert über direkte Protein-Protein-Interaktion mit weiteren Transkriptionsfaktoren. Bei Nourbakhsh & Hauser (1999) wurde bereits gezeigt, dass NRF an NFκB Faktoren *in vitro* bindet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die NRF-NF-κB p65 (kurz: p65)-Interaktion *in vivo* charakterisiert und auf eine spezifische Aminosäuresequenz eingegrenzt. Darüber hinaus sollten weitere Interaktionspartner durch ein geeignetes Testsystem *in vivo* identifiziert werden.

Für die Beantwortung dieser Fragestellungen wurde die Methode der TAP-Fusionsproteinaufreinigung (von: Tandem affinity purification) herangezogen.

2.1.1. Tandem affinity purification (TAP)

Diese Proteinaufreinigung dient der Charakterisierung von Multi-Proteinkomplexen und Proteininteraktionen innerhalb einer Zelle (Rigaut *et al.*, 1999).

Dabei handelt es sich bei dieser Methode um eine zweifache Aufreinigung. Zur Identifikation eines Zielproteins muss dieses N- oder C-terminal mit einer endständigen TAP-Domäne (TAPtag) fusioniert werden. Diese besteht aus zwei Immunglobulin-bindenden Domänen des Protein A von *Staphylococcus aureus*, einer TEV (von: Tobacco Etch Virus)-Protease-Erkennungsstelle und dem Calmodulin-bindenden Peptid.

Das TAP-Fusionsprotein wird in einem ersten Aufreinigungsschritt über das Protein A an agarosegekoppelte IgG-Antikörper gebunden. Um diese starke Bindung unter nativen Bedingungen zu lösen, erfolgt eine TEV-Protease-Spaltung. In einem zweiten Aufreinigungsschritt wird eine Affinitätschromatographie unter Zusatz von Ca^{2+} durch Kopplung des Calmodulin-bindenden Peptids an eine Calmodulin-Matrix durchgeführt. Bei der Durchführung der TAP-Methode werden nur geringe Konzentrationen denaturierender Substanzen verwendet. Mitaufgereinigte Proteinkomplexe bleiben stabil. Darüber hinaus können, aufgrund der zweistufigen Aufreinigung,

Proteine spezifisch isoliert werden. So wird die Wahrscheinlichkeit von Kontaminationen durch mitaufgereinigte Komponenten reduziert. Allerdings resultiert diese Spezifität in einer verminderten Proteinausbeute.

Ursprünglich wurde die TAP-Fusionsproteinaufreinigung für Hefen entwickelt (Rigaut *et al.*, 1999) und mit großem Erfolg bei der Isolation und Identifikation von Proteinkomplexen eingesetzt (Rigaut *et al.*, 1999 & Gavin *et al.*, 2002). Aufgrund der begrenzten Zellzahl, Ausbeute des Fusionsproteins und Konkurrenz durch endogene Proteine, ist die Übertragung dieser Methode auf Säugerzellen mit Schwierigkeiten verbunden. Daher wurden bereits Modifikationen, wie bei Drakas *et al.* (2005) beschrieben, in das ursprüngliche TAPtag eingefügt.

A

```

<spacer> CBPtag
ATG GAA AAG AGA AGA TGG AAA AAG AAT TTC ATA GCC GTC TCA GCA GCC AAC
M E K R R W K K N F I A V S A A N

<spacer>
CGC TTT AAG AAA ATC TCA TCC TCC GGG GCA CTTGAT TAT GAT ATT CCA ACT A
R F K K I S S S G A L D Y D I P T T

TEV site <spacer> Protein A
CT GCT AGC GAG AAT TTG TAT TTT CAG GGT GAG CTC AAA ACC GCG GCT CTT GC
A S E N L Y F Q G E L K T A A L A

G CAA CAC GAT GAA GCC GTG GAC AAC AAA TTC AAC AAA GAA CAA CAA AAC GC
Q H D E A V D N K F N K E Q Q N A

G TTC TAT GAG ATC TTA CAT TTA CCT AAC TTA AAC GAA GAA CAA CGA AAC GCC
F Y E I L H L P N L N E E Q R N A

TTC ATC CAA AGT TTA AAA GAT GAC CCA AGC CAA AGC GCT AAC CTT TTA GCA G
F I Q S L K D D P S Q S A N L L A E

AA GCT AAA AAG CTA AAT GAT GCT CAG GCG CCG AAA GTA GAC AAC AAA TTC A
A K K L N D A Q A P K V D N K F N

AC AAA GAA CAA CAA AAC GCG TTC TAT GAG ATC TTA CAT TTA CCT AAC TTA AA
K E Q Q N A F Y E I L H L P N L N

C GAA GAA CAA CGA AAC GCC TTC ATC CAA AGT TTA AAA GAT GAC CCA AGC CA
E E Q R N A F I Q S L K D D P S Q

A AGC GCT AAC CTT TTA GCA GAA GCT AAA AAG CTA AAT GGT GCT CAG GCG CC
S A N L L A E A K K L N G A Q A P

STOP
G AAA GTA GAC GCG AAT TCC GCG GGG AAG TCA ACC TGA
K V D A N S A G K S T *

```

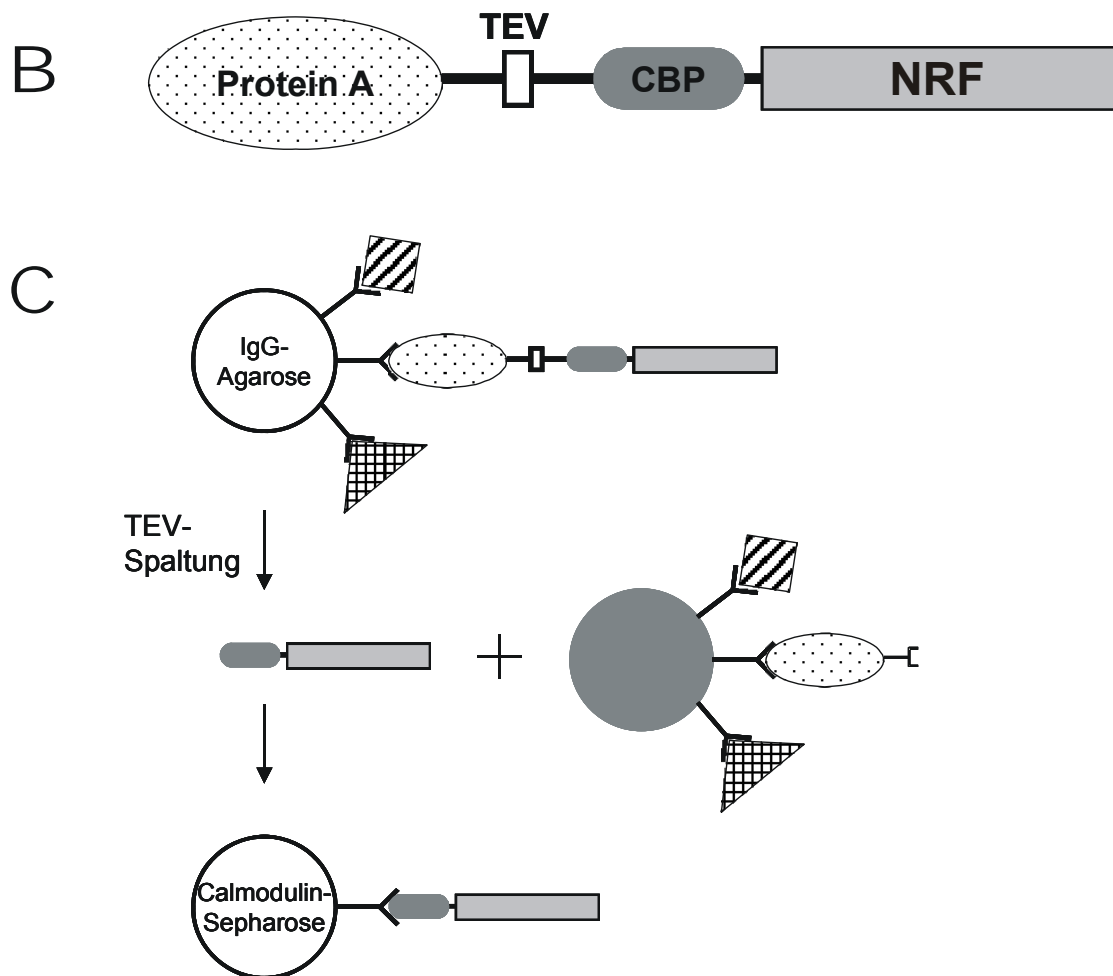


Abb. 2.1. Die TAP-Fusionsproteinaufreinigung

(A) Abbildung der Aminosäure- und Nukleotidsequenz des TAPtag (B) Aufbau des NRF-TAP-Fusionsproteins (C) Schematische Darstellung der TAP-Aufreinigung

2.1.2. Herstellung der NRF-TAP-Fusionsproteine

Aus Reporterexperimenten geht hervor, dass die N-terminale Domäne von NRF (Aminosäure 1-296) die transkriptionelle Aktivität von NF- κ B inhibiert (Nourbakhsh & Hauser, 1999). Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurden für Interaktionsuntersuchungen und der Eingrenzung der Interaktionsdomäne sukzessiv C-terminal verkürzte NRF-TAP-Fusionsproteine konstruiert. Die für die anfänglichen Versuche verwendeten und NRF-TAP kodierenden Plasmide sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst. Darüber hinaus wurde ein Kontrollplasmid (pcDNA3TAP) eingesetzt, welches ausschließlich die TAP-Domäne exprimierte.

Plasmid	NRF-Aminosäure-sequenz	Primerbezeichnung
pNRF2722TAP	1-690	BNRF2702
		HNNRF654
pNRF1793TAP	1-380	BNRF1773
		HNNRF654
pNRF1091TAP	1-149	BNRF1071
		HNNRF654
pCDNA3TAP	-	

Tab. 2.1. Plasmidbezeichnung, Aminosäuresequenz und Primerauswahl für die Klonierung der jeweiligen NRF-TAP kodierenden Plasmide

Dabei enthält das NRF-TAP-Fusionsprotein pNRF2722TAP die vollständige NRF-Aminosäuresequenz. In **Abb. 2.2.** ist die Herstellung dieser NRF-TAP kodierenden Vektoren am Beispiel von pNRF2722TAP dargestellt.

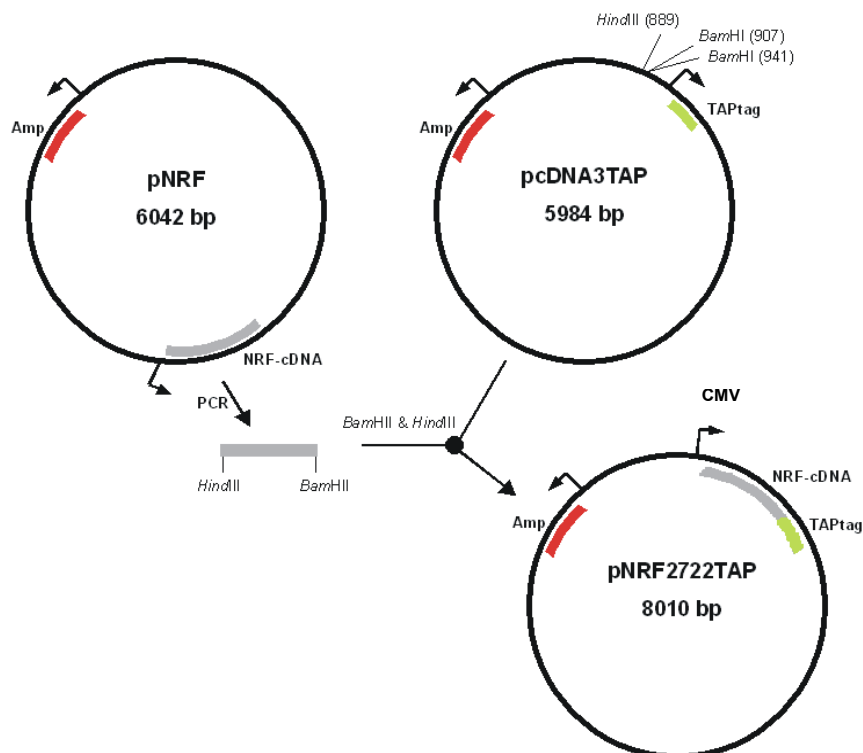


Abb. 2.2. Schematische Darstellung der Klonierung von NRF-TAP kodierenden Plasmiden am Beispiel von pNRF2722TAP (Genbank Nr. NM_017544)

Die Gewinnung der amplifizierten NRF-cDNA erfolgte durch PCR (s. 4.2.4.10.) über den Vektor pNRF. Dieser enthält die humane cDNA von NRF (grau). Die für die jeweilige PCR eingesetzten Primer sind in **Tabelle 2.1.** aufgeführt. Durch die Aus-

wahl der Primer war das Startkodon von NRF, nicht aber das Stoppkodon, auf der cDNA enthalten. Zudem wurden zwei weitere Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *HindIII* und *BamHI* vor bzw. hinter die NRF-Sequenzen eingefügt. So konnten die amplifizierten DNA-Fragmente nach Schneiden mit *HindIII* und *BamHI* isoliert werden (s. 4.2.4.5. B). Die anschließende Ligation (s. 4.2.4.6.) erfolgte mit dem ebenfalls mit *HindIII* und *BamHI* geschnittenen Vektor pcDNA3TAP. Hierdurch wurde die TAP-Domäne (grün) C-terminal an die einzelnen NRF-Sequenzen kloniert. Dieser Terminus wurde gewählt, da die Interaktionsdomäne im N-terminalen Bereich vermutet wurde (Nourbakhsh & Hauser, 1999). Durch die C-terminale Fusion sollte das N-terminale Ende von NRF nicht sterisch behindert werden. Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten NRF-TAP-Konstrukte und die erstellten NRF-Mutanten standen unter der Kontrolle eines Promotors aus dem Cytomegalovirus (CMV).

Die bereits durchgeführten Bindungsstudien von NRF an verschiedene NF- κ B Faktoren wurden an bakteriell hergestelltem Glutathion S-Transferase (GST)-NRF *in vitro* erzielt (Nourbakhsh & Hauser, 1999). In eukaryontischen Zellen liegt NRF konstitutiv phosphoryliert vor (Niedick *et al.*, 2004). Diese Modifikation könnte sowohl auf die Interaktion von NRF mit NF- κ B Proteinen als auch auf die Funktion von NRF einen Einfluss ausüben. Unveröffentlichte Analysen an 15mer-Oligopeptiden zeigen, dass die Aminosäuren Tyrosin (Y) 97, Tyrosin (Y) 100 und Serin (S) 106 potentielle Phosphorylierungsstellen darstellen.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde untersucht, ob diese Phosphorylierungsstellen einen Einfluss auf die NRF-NF- κ B-Interaktion ausüben. Hierfür wurden diese drei phosphorylierten Aminosäuren in NRF zu Alanin mutiert.

In **Abb. 2.3.** ist die Klonierung dieser Mutanten schematisch dargestellt. Die Herstellung der NRF-Phosphorylierungsmutanten erfolgte über *in vitro* Mutagenese (s. 4.2.4.7.). Bei den eingesetzten Primern handelte es sich um NRFPHOMU5 und NRFPHOMU3 (s. 4.1.8.). Die so konstruierten Vektoren wurden als pNRF2722TAP Mut1 bzw. pNRF1091TAPMut1 bezeichnet.

Um diese Mutationen in pNRF1793TAP durchzuführen, wurde sowohl pNRF1793TAP als auch pNRF1091TAPMut1 mit *EcoRI* geschnitten (s. 4.2.4.5. B). Anschließend wurde jeweils das kleine Fragment aus pNRF1793TAP und das größere Fragment aus der Phosphorylierungsmutante pNRF1091TAPMut1 isoliert und beide miteinander ligiert (s. 4.2.4.6.).

Die entstandenen NRF-TAP kodierenden Vektoren sowie die entsprechenden Phosphorylierungsmutanten wurden in den verwendeten HeLa-Zellen überexprimiert, was die Aufreinigung einer ausreichenden Menge von NRF-TAP-Konstrukten gewährleistete.

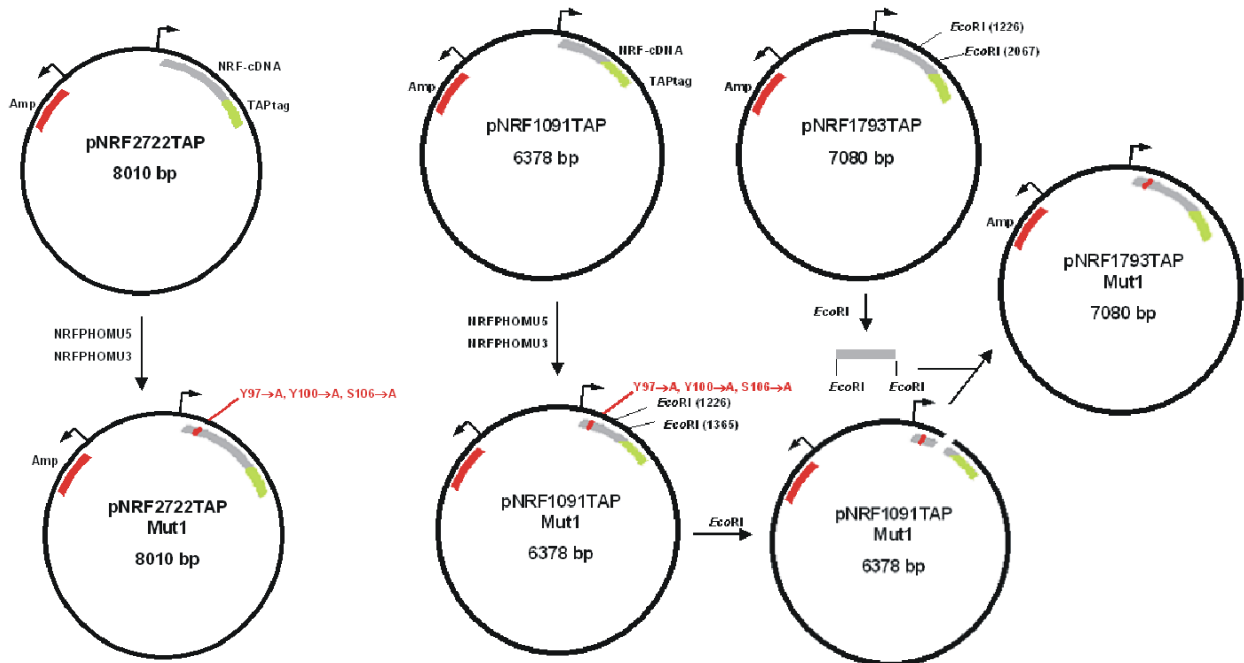


Abb. 2.3. Übersicht der Konstruktion der Phosphorylierungsmutanten

2.1.3. Nachweis der Expression der NRF-TAP-Fusionsproteine in HeLa-Zellen

Die einzelnen NRF-TAP kodierenden Plasmide wurden durch transiente Transfektion (s. 4.2.1.3.) in HeLa-Zellen überführt. Für diese Arbeiten wurde die humane Zelllinie HeLa Bujard (HeLa B) verwendet (Gossen & Bujard, 1992).

Teilweise wurden die Zellen vor der Lyse für jeweils eine Stunde mit IL-1 oder NDV stimuliert (s. 4.2.1.4.). So konnten Fragen, die die Änderung der Interaktionseigenschaften nach Stimulation behandelten, untersucht werden. Dieses ist vor allem in Bezug auf die duale Funktion, die NRF auf den IL-8-Promotor ausübt (s. 1.6.3.), von Interesse.

Insbesondere in Hinblick auf die Interaktionsuntersuchungen von NRF zu p65 wurde eine anschließende Fraktionierung der Zelllysate in eine Cytosol- und Kernfraktion vorgenommen (s. 4.2.1.6. A). So konnte bei der nachfolgenden TAP-Aufreinigung (s.

4.2.2.1.) durch anfängliche Inkubation der Kernfraktion mit den agarosegekoppelten IgG-Antikörpern das vornämlich kernständige NRF angereichert werden.

Im Gegenteil dazu kommt p65 im nichtstimulierten Zustand vorwiegend im Cytosol vor (s. 1.5.1.). Aus diesem Grund konnte p65, durch nachfolgende Inkubation der Cytosolfraction mit den vorbehandelten IgG-Antikörpern, an das angereicherte NRF binden.

Für die Verifikation der Transfektion sowie als qualitativer Abgleich unterschiedlicher Konzentrationen der NRF-TAP-Fusionsproteine wurden die Zelllysate im Western Blot (s. 4.2.2.4.) zuvor abgeglichen. Hierzu wurde ein Peroxidase anti-Peroxidase (PAP)-Antikörper (s. 4.1.7.) eingesetzt, durch den die NRF-TAP-Fusionsproteine über das Protein A der TAP-Domäne nachgewiesen werden konnten.

2.2. Nachweis der NRF-NF- κ B (p65)-Interaktion *in vivo*

Nourbakhsh & Hauser (1999) wiesen die Interaktion von NRF mit NF- κ B Faktoren *in vitro* nach. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird diese Bindung *in vivo* überprüft.

2.2.1. Detektion der NRF-p65-Interaktion *in vivo* im nichtstimuliertem Zustand

Für den Nachweis der NRF-p65-Interaktion wurden transient transfizierte, nicht-stimulierte HeLa B-Zellen eingesetzt und hieraus das NRF-TAP-Protein, wie in 2.1.3. beschrieben, isoliert. Dabei wurde pro Ansatz ein einziger, für NRF-TAP kodierender Vektor transfiziert. Bei den Proteinen NRF(1-690)TAP handelte es sich um das transfizierte Plasmid pNRF2722TAP, bei NRF(1-380)TAP um den eingesetzten Vektor pNRF1793TAP und bei NRF(1-149)TAP um pNRF1091TAP. Die Zahlen in Klammern stehen für die Aminosäuresequenz des jeweiligen NRF-TAP-Fusionsproteins. Zudem wurde die TAP-Domäne allein exprimiert. Sie diente als Negativkontrolle.

Die NRF-TAP-Fusionsproteine wurden anschließend mittels PAP-Antikörper (**Abb. 2.4. (A)**), das endogene p65 mit anti-p65-Antikörper detektiert.

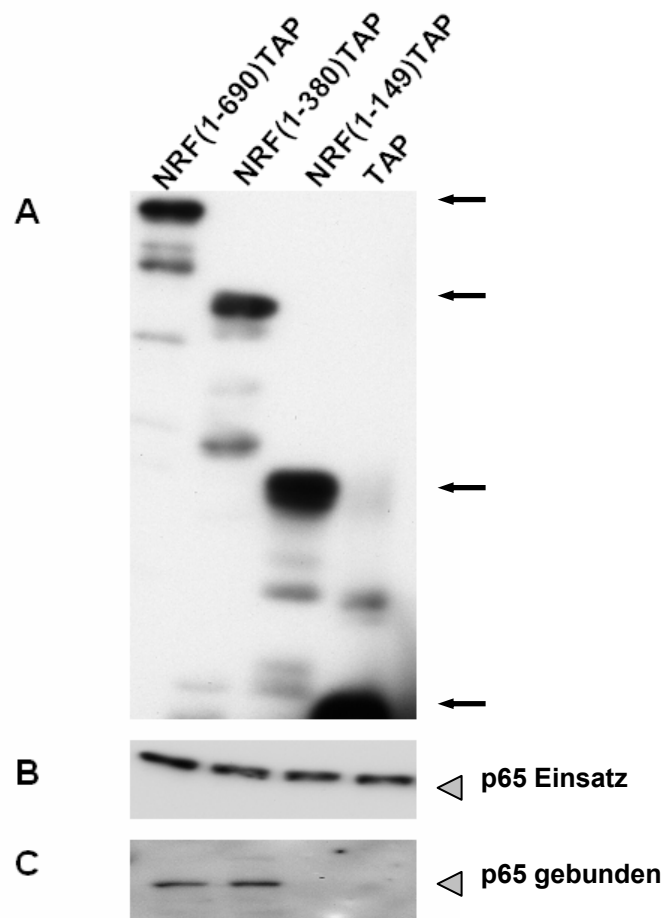


Abb. 2.4. Nachweis der NRF-p65-Interaktion *in vivo* im nichtstimuliertem Zustand

(A) Detektion und Abgleich der eingesetzten NRF-TAP-Fusionsproteine nach Aufreinigung über die agarosegekoppelten IgG-Antikörper. Der Nachweis erfolgte mittels Western Blot und PAP-Antikörper. Die Banden der einzelnen NRF-TAP-Proteine sind durch schwarze Pfeile markiert. (B) Detektion des endogenen p65 in den verwendeten Zelllysaten der einzelnen Ansätze. Für die Untersuchung wurde ein monoklonaler Antikörper gegen p65 aus der Maus eingesetzt. Die p65-Proteinbanden sind durch ein graues Dreieck hervorgehoben. (C) Nachweis des p65, welches an die transfizierten NRF-TAP-Fusionsproteine nach zweifacher TAP-Aufreinigung gebunden war. Das interagierende p65 ist durch ein graues Dreieck markiert.

Wie in **Abb. 2.4. (B)** zu sehen ist, war die Konzentration des endogenen p65 in jedem Ansatz zu Beginn der TAP-Aufreinigung gleich. Nach zweifacher Aufreinigung zeigte die Detektion mit anti-p65-Antikörper, dass p65 mit NRF(1-690)TAP und NRF(1-380)TAP, jedoch nicht mit NRF(1-149)TAP interagierte (**Abb. 2.4. (C)**). Zudem konnte eine unspezifische Bindung an die TAP-Domäne allein nicht festgestellt werden. Aus den Ergebnissen geht hervor, dass durch die Verkürzung von NRF(1-380)TAP zu NRF(1-149)TAP ein für die Interaktion mit p65 essentieller Bereich auf dem Protein deletiert worden ist. Somit scheinen die Aminosäuren 149-380 eine mögliche minimale Interaktionsdomäne mit p65 zu begrenzen. Diese Unter-

suchungen zeigen darüber hinaus, dass die Interaktion von NRF mit p65 *in vivo* anhand der TAP-Fusionsproteinaufreinigung (s. 4.2.2.1.) bestätigt werden konnte.

Kurz anzumerken ist hier, dass neben der für das jeweilige Protein spezifischen Proteinbande zusätzliche, kleinere Banden in jedem Transfektionsansatz auftraten. Dieses könnte auf unterschiedliche Translationsstarts im N-terminalen Bereich von NRF zurückgeführt werden.

Dieses Ergebnis diene als Grundlage für eine weitere Eingrenzung der NRF-p65-Interaktionsdomäne auf NRF. Auf diese Fragestellung wird in 2.4. näher eingegangen.

Um den Einfluss der Phosphorylierung auf die Interaktion von NRF mit p65 zu bestimmen, wurden die in 2.1.2. beschriebenen Phosphorylierungsmutanten der einzelnen NRF-TAP-Fusionsproteine untersucht.

Nach Expression von NRF(1-690)TAP und NRF(1-380)TAP sowie den jeweiligen Phosphorylierungsmutanten in HeLa B-Zellen, wurde die TAP-Aufreinigung, wie in 2.1.3. beschrieben, durchgeführt. Der Konzentrationsabgleich erfolgte mittels PAP-Antikörper.

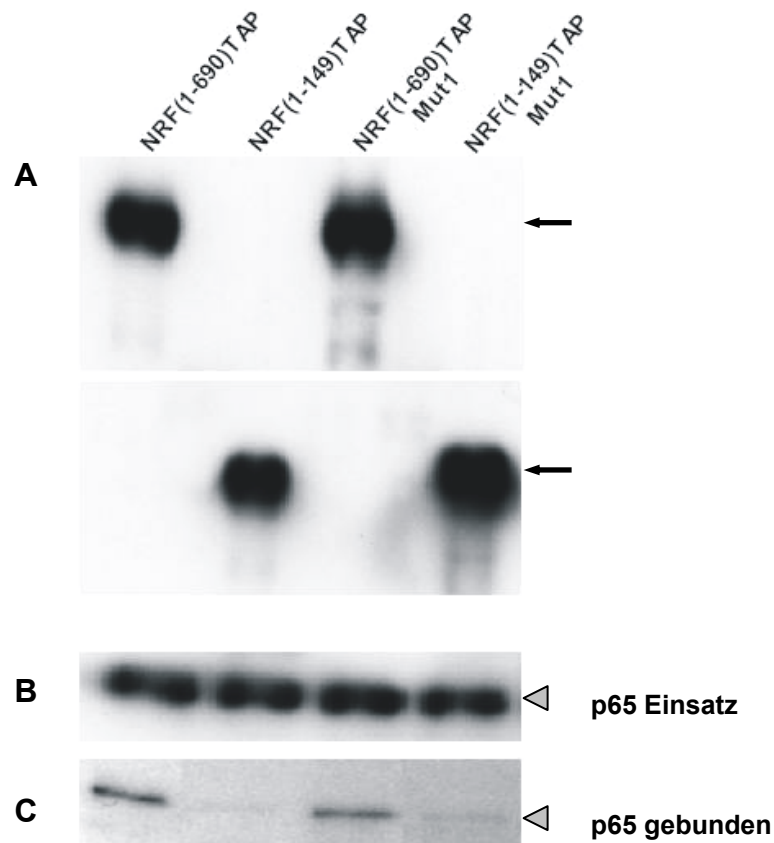


Abb. 2.5. Vergleich der NRF-p65-Interaktion *in vivo* mit phosphorylierten NRF-TAP-Proteinen und mit den entsprechenden Phosphorylierungsmutanten

(A) Darstellung der abgeglichenen Kernfraktionen der Zelllysate der NRF-TAP-Fusionsproteine NRF(1-690)TAP und NRF(1-149)TAP und der jeweiligen Phosphorylierungsmutanten. Die Detektion wurde mittels Western Blot und anti-p65-Antikörper durchgeführt. Die Positionen der einzelnen NRF-TAP-Proteine sind durch schwarze Pfeile markiert. (B) Detektion des zu Beginn der TAP-Aufreinigung pro Ansatz vorhandenen p65 anhand eines anti-p65-Antikörpers. Die p65-Proteinbanden sind durch ein graues Dreieck herausgestellt. (C) Nachweis des nach zweifacher Aufreinigung mit NRF-TAP interagierenden p65 durch anti-p65-Antikörper. Die entsprechenden Banden sind durch ein graues Dreieck hervorgehoben.

Wie in **Abb. 2.5. (C)** dargestellt, war nach zweifacher Aufreinigung eine Interaktion von p65 mit dem vollständigen NRF(1-690)TAP nachzuweisen. Mit dem C-terminal verkürzten NRF(1-149)TAP interagierte p65 nur sehr schwach. Dabei übte die Phosphorylierungsmutante keinen Einfluss auf diese Bindung aus. Sowohl NRF(1-690)TAP und die Mutante NRF(1-690)TAPMut1 interagierten mit p65 vergleichbar stark.

Vor dem Hintergrund der geringeren Bedeutung der Dephosphorylierung auf die Änderung der Interaktion von NRF mit p65, wurden die weiteren Versuche ausschließlich mit den phosphorylierten NRF-TAP-Fusionsproteinen durchgeführt.

2.2.2. Nachweis der NRF-p65-Interaktion *in vivo* nach IL-1-Stimulation

Um die Interaktionseigenschaften zwischen NRF und p65 nach Stimulation zu untersuchen, wurden die transient transfizierten HeLa B-Zellen vor der Lyse für eine Stunde mit IL-1 inkubiert (s. 4.2.1.4.). Dabei erfolgte die Herstellung der Kern- und Cytosolfraktion, der Konzentrationsabgleich der einzelnen Zelllysate und die anschließende TAP-Aufreinigung entsprechend 2.1.3.

Aus **Abb. 2.6. (C)** geht hervor, dass nach IL-1-Stimulation p65 an NRF(1-690)TAP und NRF(1-380)TAP gebunden vorlag, jedoch nicht an NRF(1-149)TAP. Unspezifische Bindungen von p65 an die TAP-Domäne konnten vernachlässigt werden.

Im Vergleich zu den Untersuchungen an nichtstimulierten Zellen (**Abb. 2.4. (C)**), war nach Induktion mit IL-1 keine Verstärkung oder Schwächung in der Bindungseffizienz der Interaktion von p65 mit den NRF-TAP-Proteinen festzustellen. Zwar war nach Stimulation eine Reduktion in der Quantität des gebundenen p65 zu beobachten. Dieses konnte jedoch nicht durchgehend in nachfolgenden Versuchen bestätigt werden. Darüber hinaus war keine Veränderung der Bindedomäne auf NRF zu beobachten.

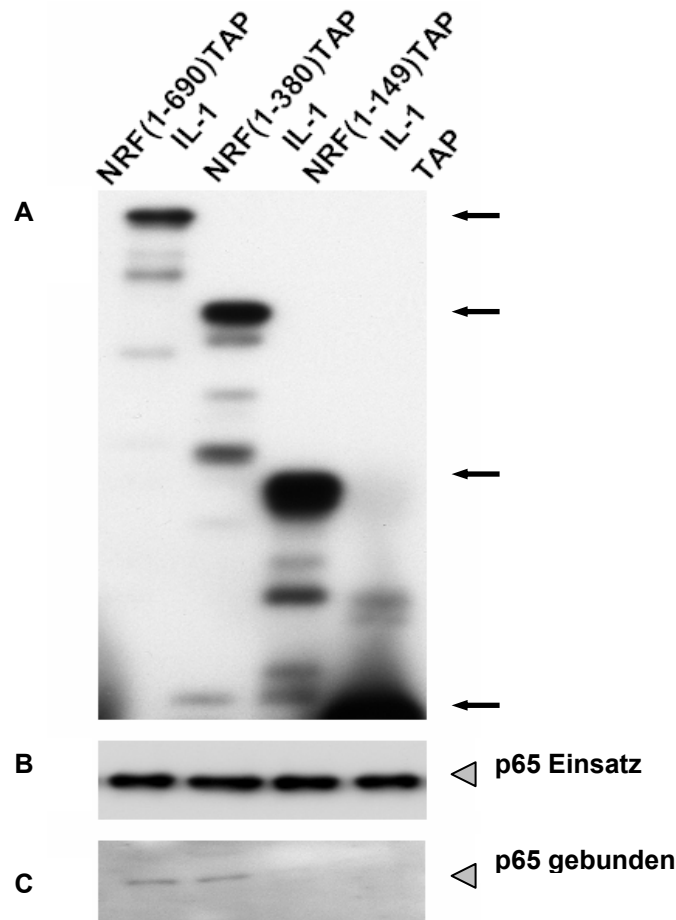


Abb. 2.6. Nachweis der NRF-p65-Interaktion *in vivo* nach IL-1-Stimulation

(A) Darstellung der nach Konzentrationsabgleich und nach Bindung an die agarosege-koppelten IgG-Antikörper detektierten NRF-TAP-Fusionsproteine. Der Nachweis erfolgte durch Western Blot und PAP-Antikörper. Die Positionen der einzelnen Fusionsproteine sind durch schwarze Pfeile markiert. (B) Detektion des endogenen p65 in den jeweiligen Lysaten mit anti-p65-Antikörper. Die Höhe der p65-Proteinbanden ist durch ein graues Dreieck dargestellt. (C) Nachweis des mit den einzelnen Fusionsproteinen interagierenden p65 nach zweifacher Aufreinigung durch anti-p65-Antikörper. Dabei sind die Proteinbanden von p65 anhand eines grauen Dreiecks hervorgehoben.

2.2.3. Nachweis der NRF-p65-Interaktion *in vivo* nach NDV-Stimulation

Neben der Stimulation mit IL-1 wurde untersucht, ob die NRF-p65-Interaktion durch virale Stimuli beeinflusst werden konnte.

Hierzu wurden transient transfizierte HeLa B-Zellen für eine Stunde vor der Lyse mit Newcastle Disease Virus (NDV) inkubiert (s. 4.2.1.4.). Die Fraktionierung der Lysate, der Konzentrationsabgleich und die Aufreinigung wurden entsprechend 2.1.3. durchgeführt.

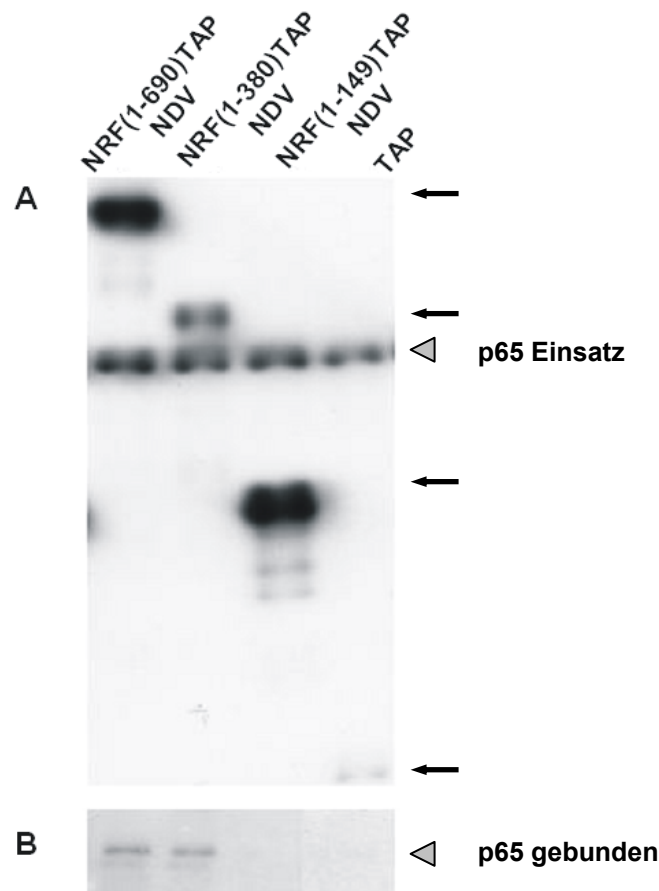


Abb. 2.7. Nachweis der NRF-p65-Interaktion *in vivo* nach NDV-Stimulation

(A) Detektion der Kernfraktionen der Zellysate der jeweiligen NRF-TAP-Fusionsproteine durch Western Blot mit anti-p65-Antikörper. Der Konzentrationsabgleich der NRF-TAP-Proteine wurde nachträglich durchgeführt. Die Positionen der einzelnen Fusionsproteine werden durch schwarze Pfeile herausgestellt. Die Banden des endogenen p65 sind durch ein graues Dreieck markiert. (B) Nachweis von p65, welches nach zweifacher TAP-Aufreinigung an die Fusionsproteine gebunden vorlag. Die Proteinbanden des interagierenden p65 sind durch ein graues Dreieck hervorgehoben. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines anti-p65-Antikörpers.

Wie in **Abb. 2.7. (B)** dargestellt, interagierte endogenes p65 mit dem vollständigen NRF(1-690)TAP sowie mit NRF(1-380)TAP. Bei dem NRF(1-149)TAP war keine Bindung an p65 festzustellen. Unspezifische Interaktion von p65 an die TAP-Domäne war hier kaum nachweisbar.

Im Vergleich zu den bereits dargestellten Ergebnissen trat nach Stimulation mit NDV keine wesentliche Stärkung oder Schwächung der Bindungseffizienz der NRF-p65-Interaktion auf. Eine Änderung der Interaktionseigenschaften auf NRF konnte zudem nicht festgestellt werden.

2.3. Untersuchung der Interaktion von NRF mit weiteren Komponenten der Transkriptionsmaschinerie

Die NF- κ B Faktoren (s. 1.5.) liegen in Form von Homo- und Heterodimeren vor, wobei die Kombination p50-p65 am häufigsten in der Zelle vorkommt (Moynagh, 2005). So wurde, neben der Interaktion von NRF mit p65, eine Bindung mit p50 *in vitro* detektiert (Nourbakhsh & Hauser, 1999). Vor diesem Hintergrund lag es nahe, Untersuchungen der NRF-p50-Interaktion durchzuführen.

Neben dem Transkriptionsfaktor NRF und den NF- κ B Faktoren lagern sich eine Vielzahl weiterer Proteine an die Promotoren unterschiedlicher Gene an, was eine Interaktion von NRF mit zusätzlichen Komponenten an diesem Promotor und an Promotoren weiterer Gene nahelegt.

Auf dieser Grundlage wurde während dieser Arbeit die Interaktion von NRF zu p50 und weiteren Proteinen der Transkriptionsmaschinerie *in vivo* untersucht. Bei diesen Versuchen wurde ebenfalls die TAP-Aufreinigung als Methode für die Isolation verschiedener NRF-TAP-Fusionsproteine gewählt.

2.3.1. Untersuchung der NRF-p50-Interaktion *in vivo*

Die Interaktionsuntersuchungen von NRF mit p50 basierten auf der Isolation der NRF-TAP-Fusionsproteine über die TAP-Domäne nach transienter Transfektion in HeLa B-Zellen (s. 2.1.3.). Größtenteils wurden hierzu bereits benutzte PVDF-Membranen nach Western Blot (s. 4.2.2.4.) erneut verwendet und auf Interaktion von NRF mit p50 untersucht. Für die Detektion wurde ein monoklonaler anti-p50-Antikörper aus der Maus eingesetzt.

Aus **Abb. 2.8. (B)** geht hervor, dass ausschließlich eine sehr schwache Interaktion von p50 mit NRF(1-690)TAP und NRF(1-380)TAP nachgewiesen werden konnte. Eine Bindung von p50 an die TAP-Domäne allein und an die NRF-TAP-Fusionsproteine von IL-1 stimulierten HeLa B-Zellen konnte nicht detektiert werden.

Diese sehr schwache Interaktion könnte durch versuchsbedingte Aspekte, wie die Qualität der Membran oder der eingesetzten Antikörper, erklärt werden. Aus Beobachtungen während der Arbeiten ging hervor, dass Detektionsverluste aufgrund

einer erneuten Verwendung der Membran größtenteils ausgeschlossen werden konnten.

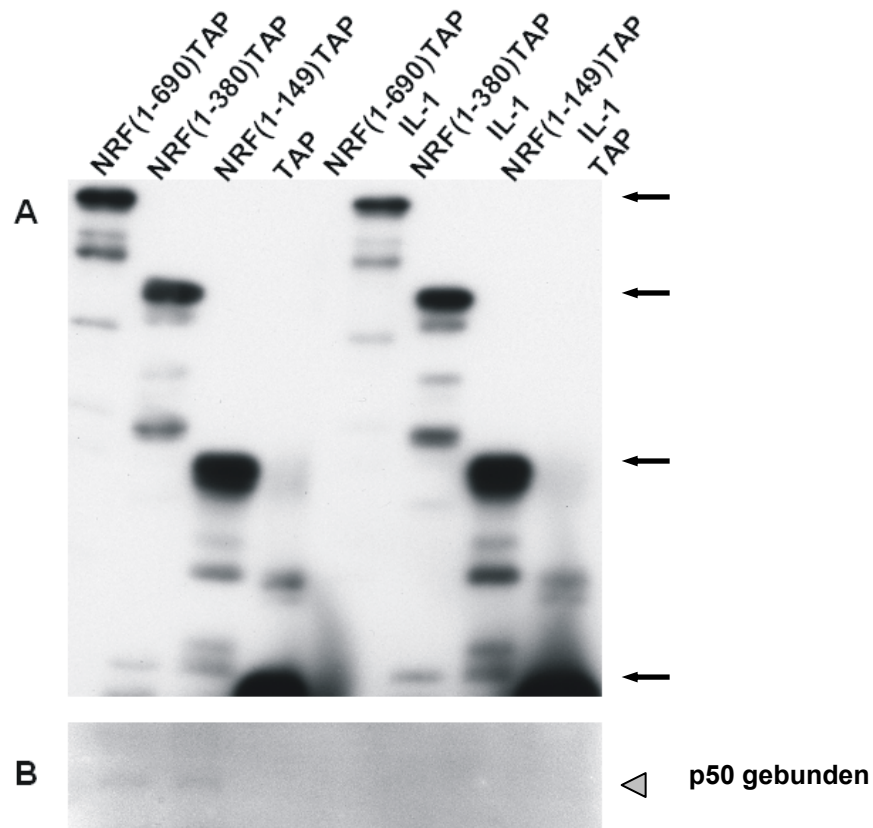


Abb. 2.8. Interaktionsuntersuchungen von NRF mit p50 *in vivo*

(A) Nachweis der Expression der NRF-TAP-Fusionsproteine nach Beendigung des ersten Aufreinigungsschrittes (IgG-Antikörper) in nichtstimulierten HeLa B-Zellen und in Zellen nach IL-1-Stimulation. Die Konzentration der Fusionsproteine wurde durch Western Blot und PAP-Antikörper abgeglichen. Die einzelnen NRF-TAP-Proteine sind durch schwarze Pfeile markiert. (B) Untersuchung der NRF-p50-Interaktion nach zweifacher Aufreinigung ohne bzw. nach Inkubation mit IL-1. Hierfür wurden unspezifische Bindungen auf der PVDF-Membran blockiert und diese anschließend mit monoklonalem anti-p50-Antikörper aus der Maus inkubiert.

Darüber hinaus ließ die Stärke der p50-Bande, die aus noch nicht aufgereinigten Kern- und Cytosolfractionen nachgewiesen wurde, auf eine gute Qualität des eingesetzten Antikörpers schließen (s. **Abb. 2.9.**).

Untersuchungen der Überstände nach dem ersten Aufreinigungsschritt deuteten vielmehr auf eine tatsächlich schwächere Interaktion von p50 zu den NRF-TAP-Proteinen hin (s. **Abb. 2.9.**). Bei diesen Versuchen wurden, für die Begünstigung der Interaktion von NRF mit p50, zusätzlich zu den NRF-TAP-Konstrukten für p50 kodierende Vektoren in HeLa B-Zellen kotransfiziert (s. 4.2.1.3.).

Während der Versuche wurden, wie in 2.1.3. beschrieben, zunächst die NRF-TAP-Proteine (Kernfraktion) über die agarosegekoppelten IgG-Antikörper aufgereinigt.

Durch anschließende Inkubation mit der Cytosolfraktion konnte das überexprimierte p50 an die Fusionsproteine binden. Nach diesem Aufreinigungsschritt wurde der nichtgebundene Überstand auf den Anteil von p50 untersucht, der nicht mit den NRF-TAP-Fusionsproteinen interagierte.

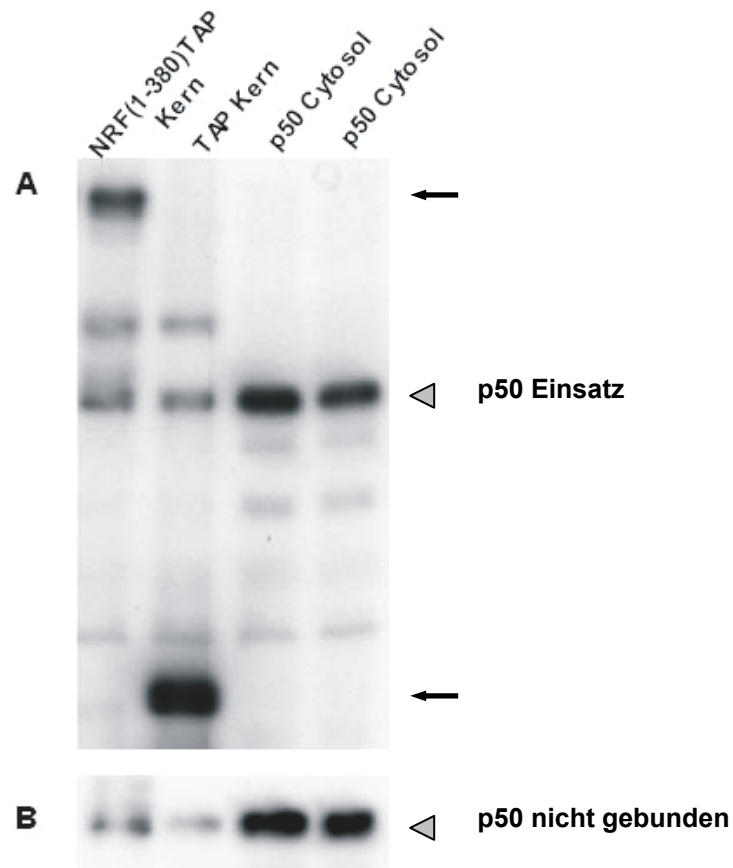


Abb. 2.9. Untersuchung der Überstände nach Inkubation von NRF(1-380)TAP mit p50 überexprimierten Cytosolfractionen

(A) Detektion der Expression von NRF(1-380)TAP, der TAP-Domäne aus der Kernfraktion und von p50 aus der Cytosolfraktion in HeLa B-Zellen. Der Nachweis erfolgte mittels Western Blot und monoklonalen anti-p50-Antikörpers aus der Maus. Dabei ist die Höhe der p50-Proteinbanden mit einem grauen Dreieck markiert. NRF(1-380)TAP sowie das TAPtag allein sind durch einen schwarzen Pfeil herausgestellt. **(B)** Untersuchung der Konzentration des nicht gebundenen p50 nach dem ersten Aufreinigungsschritt (IgG-Antikörper). Hierzu wurde der Anteil von p50 aus den Überständen mit einem monoklonalen anti-p50-Antikörper detektiert. Das graue Dreieck hebt die p50-Bande hervor.

In **Abb. 2.9. (A)** ist zu sehen, dass p50 hauptsächlich im Cytosol vorlag. Darüber hinaus war die Konzentration von p50 in der Kernfraktion in Form einer entsprechenden Proteinbande gut nachweisbar.

Abb. 2.9. (B) zeigt, dass nach dem ersten TAP-Aufreinigungsschritt ein beachtlicher Teil dieses überexprimierten p50 nicht mit NRF(1-380)TAP interagierte. Somit war der Anteil an p50 im nichtgebundenen Überstand hoch, zumal die Konzentration des

Proteins nach zweifacher Aufreinigung nicht detektierbar war (Ergebnis nicht dargestellt).

Dieses Ergebnis und die Versuche, die in **Abb. 2.8. (B)** zu sehen sind, deuten auf keine bzw. eine sehr schwache Bindung von p50 an NRF hin.

2.3.2. Untersuchung der Interaktion von NRF mit weiteren Komponenten *in vivo*

Wie in 2.3. begründet, wurde die Bindung von weiteren Faktoren der Transkriptionsmaschinerie an NRF untersucht.

Die vorbehandelten PVDF-Membranen (s. 4.2.2.4.) wurden für die Versuche der Interaktion von NRF-TAP-Proteinen mit c-Fos (62 kDa) verwendet (s. 1.3.3.). Bei dem nukleären Phosphoprotein c-Fos handelt es sich um einen heterodimeren Bestandteil des Transkriptionsfaktors AP-1 (Lu *et al.*, 2005).

Zudem wurden Untersuchungen, die die Interaktion von NRF-TAP-Proteinen mit der Histon Deacetylase1 (HDAC1) und dem Korepressor mSin3A betreffen (s. 1.3.3.), durchgeführt (Shestakova *et al.*, 2001; Tong *et al.*, 2005). Dabei beträgt das molekulare Gewicht von HDAC1 ca. 58 kDa und das von mSin3A 150 kDa. Bei HDAC1 als auch mSin3A handelt es sich um Faktoren, die die Transkriptionsinitiation negativ beeinflussen.

In **Abb. 2.10. (B)** ist das Ergebnis der Versuche, die die Interaktion von NRF-TAP-Fusionsproteinen mit c-Fos in nichtstimulierten HeLa B-Zellen und in Zellen nach IL-1-Stimulation behandelten, dargestellt. Dabei wurde eine Bindung von c-Fos nicht nur an die Fusionsproteine, sondern auch an die TAP-Domäne allein festgestellt. Somit handelte es sich um eine unspezifische Interaktion. Dieses könnte auf Verwendung eines polyklonalen Antikörpers gegen c-Fos zurückgeführt werden. Eine NRF spezifische Interaktion mit c-Fos kann anhand dieser Ergebnisse nicht postuliert werden.

Abb. 2.10. (C) und **2.10. (D)** zeigen die Ergebnisse aus den Interaktionsuntersuchungen von HDAC1 und mSin3A mit den NRF-TAP-Proteinen. Aus den Versuchen geht hervor, dass, unter den hier verwendeten Bedingungen, die Fusionsproteine nicht mit HDAC1 und mSin3A interagierten. Dennoch können diese Proteine prinzipiell durch Verwendung der hier beschriebenen Antikörpern detektiert werden.

So konnten beispielsweise HDAC1 und das nachfolgend dargestellte Protein TFIID in Lysaten von HeLa B-Zellen und Western Blot mit den aufgeführten Antikörpern nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

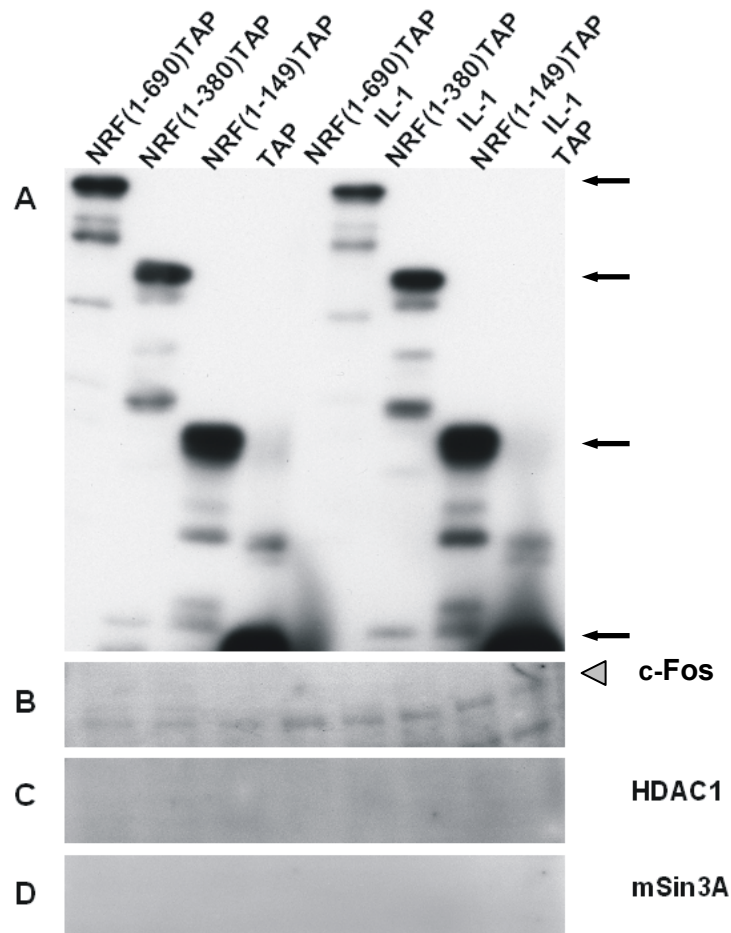


Abb. 2.10. Untersuchung der Interaktion von c-Fos, HDAC-1 und mSin3A mit NRF-TAP-Proteinen im nichtstimuliertem Zustand und nach IL-1-Stimulation

(A) Detektion der an die agarosegekoppelten IgG-Antikörper gebundenen NRF-TAP-Fusionsproteine in nichtstimulierten HeLa B-Zellen und in mit IL-1 induzierten Zellen nach Konzentrationsabgleich. Der Nachweis erfolgte anhand eines Western Blots und PAP-Antikörper. Die Proteinbanden der einzelnen NRF-TAP-Fusionsproteine sind durch schwarze Pfeile markiert. **(B)** Nachweis von c-Fos, welches nach zweifacher TAP-Aufreinigung an die Fusionsproteine im nichtstimuliertem und stimuliertem Zustand gebunden war. Hierzu wurde ein polyklonaler Antikörper gegen c-Fos aus dem Kaninchen verwendet. Die Proteinbanden von c-Fos sind durch ein graues Dreieck hervorgehoben. **(C)** Untersuchung der NRF-HDAC1-Interaktion in nichtinduzierten HeLa B-Zellen und in Zellen nach IL-1-Stimulation. Die Detektion wurde mit einem monoklonalen anti-HDAC1-Antikörper aus der Maus durchgeführt. **(D)** Untersuchung der Interaktion von NRF mit mSin3A in nichtstimulierten HeLa B-Zellen und in Zellen nach IL-1-Stimulation. Der Nachweis erfolgte mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen mSin3A aus der Maus.

Im Folgenden soll kurz auf Versuche, die die Interaktion von NRF-TAP-Fusionsproteinen mit weiteren Komponenten der Transkriptionsinitiation betreffen, eingegangen werden. Auch hierfür wurden bereits verwendete PVDF-Membranen einge-

setzt (dargestellt in 2.3.1.) und diese erneut mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert.

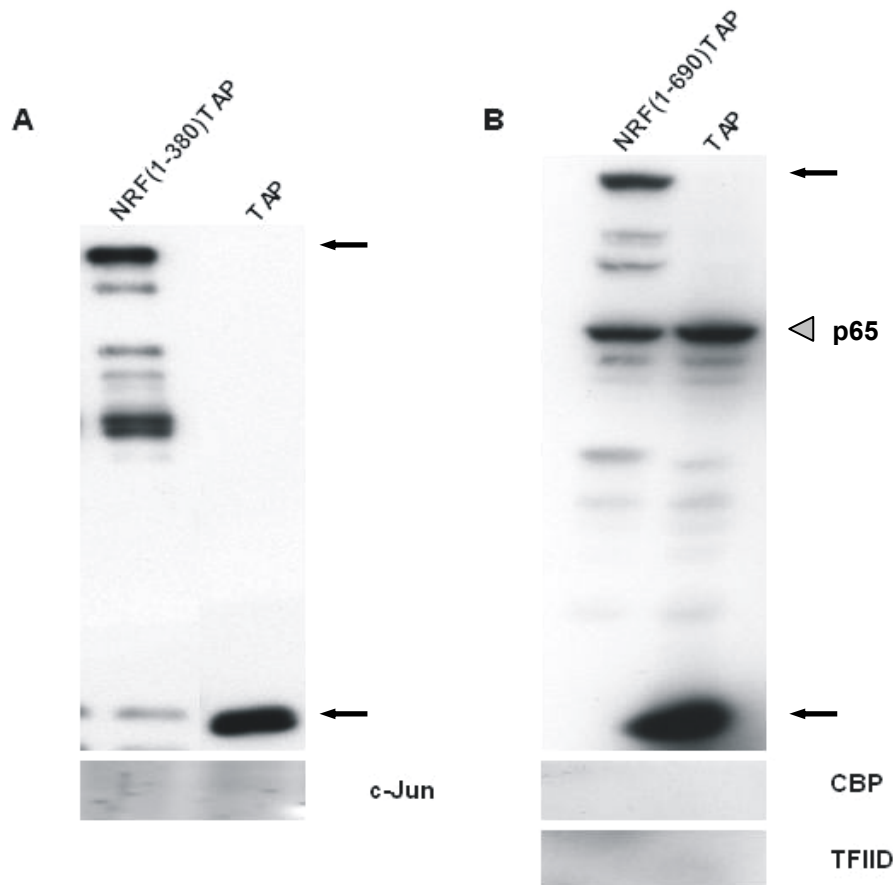


Abb. 2.11. Interaktionsuntersuchungen von c-Jun, CBP und TFIID mit NRF-TAP-Proteinen

(A) Versuche, die die Bindung von NRF(1-380)TAP an c-Jun darstellen. Im oberen Bildteil ist der Nachweis der Expression von NRF(1-380)TAP und der TAP-Domäne allein dargestellt. Hierfür wurde ein PAP-Antikörper benutzt. Die entsprechenden Proteinbanden sind durch schwarze Pfeile markiert. Der untere Bildteil stellt das Ergebnis nach zweifacher TAP-Aufreinigung dar. Für die Untersuchung wurde ein polyklonaler anti-c-Jun-Antikörper aus dem Kaninchen eingesetzt. **(B)** Untersuchung der Interaktion des vollständigen NRF(1-690)TAP mit CBP und TFIID. Im oberen Bildteil ist der Nachweis der Expression von NRF(1-690)TAP sowie der TAP-Domäne abgebildet. Hierfür wurde ein monoklonaler anti-p65-Antikörper verwendet. Die detektierten p65-Banden sind durch ein graues Dreieck hervorgehoben. NRF(1-690)TAP sowie das TAPtag sind durch einen schwarzen Pfeil markiert. Die beiden unteren Bildteile zeigen das Ergebnis nach zweifacher Aufreinigung. Dazu wurden jeweils polyklonale Antikörper gegen CBP und TFIID aus dem Kaninchen verwendet.

In einem ersten Versuch wurde die Bindung von NRF-TAP-Proteinen an c-Jun (39 kDa), einem Vertreter der Jun-Proteine, überprüft (s. 1.3.3.). Wie c-Fos ist c-Jun ein Bestandteil des Transkriptionsfaktors AP-1 (Lu *et al.*, 2005).

Für die Interaktionsuntersuchungen wurde das C-terminal verkürzte Konstrukt NRF(1-380)TAP sowie die TAP-Domäne als Negativkontrolle eingesetzt. In **Abb. 2.11. (A)** wird im oberen Bildteil eine Expressionskontrolle dieser Proteine nach Bindung an die agarosegekoppelten IgG-Antikörper dargestellt. Wie aus dem unteren

Bildteil hervorgeht, war nach zweifacher TAP-Aufreinigung keine Bindung von c-Jun an das NRF-TAP-Fusionsprotein nachweisbar.

Zudem wurde das vollständige NRF(1-690)TAP auf Interaktion mit CBP (265 kDa; s. 1.3.3.) und dem basalen Transkriptionsfaktor TFIID (36 kDa; s. 1.3.2.) untersucht. In **Abb. 2.11. (B)** im oberen Bildteil ist eine Expressionskontrolle des vollständigen NRF(1-690)TAP und der TAP-Domäne dargestellt. Durch Verwendung eines monoklonalen anti-p65-Antikörpers wurde eine zusätzliche p65-Proteinbande sichtbar (graues Dreieck).

Aus den beiden unteren Bildteilen geht hervor, dass nach zweifacher TAP-Aufreinigung weder CBP noch TFIID mit NRF(1-690)TAP interagierten.

2.3.3. Interaktionsuntersuchungen von NRF mit Faktoren der Transkriptionselongation *in vivo*

In 2.3.2. wurde auf die Interaktion von NRF-TAP-Fusionsproteinen mit Transkriptionsfaktoren, die vornehmlich an der Initiation der Genexpression beteiligt sind, eingegangen.

Wie in 1.6.3. erwähnt, bindet NRF über ein NRF-bindendes Element (NH) an das LTR (für: long terminal repeat) des Humanen Immunodefizienzvirus Typ I (HIV-1) (Dreikhausen *et al.*, 2005). Dabei inhibiert NRF die Transkriptionselongation des HIV-1 LTR in nichtstimulierten HeLa-Zellen. Es wird angenommen, dass dieses über Verhinderung der Anlagerung des Elongationsfaktors DSIF und die anschließende Bildung von Elongationskomplexen durch hyperphosphorylierte Pol II erfolgt. DSIF liegt in enger Assoziation mit NELF vor (s. 1.4.1.1.).

Vor diesem Hintergrund wurde die Interaktion von NRF mit diesen Komponenten der Transkriptionselongation untersucht. Hierfür wurden bereits verwendete PVDF-Membranen eingesetzt und diese, wie in 4.2.2.4. beschrieben, bearbeitet.

NELF ist aus fünf Polypeptiden, NELF-A bis NELF-E, zusammengesetzt (Narita *et al.*, 2003). NELF-E (46 kDa) ist ein RNA-bindendes Protein, dessen RNA-Bindeaktivität für die Funktion von NELF wesentlich ist (Narita *et al.*, 2003).

DSIF besteht aus zwei Untereinheiten, deren Molekulargewicht 160 kDa (p160) und 14 kDa (p14) beträgt. Dabei ist die cDNA von DSIF p160 homolog zu der des Trans-

kriptionsfaktors Spt5 aus *Saccharomyces cerevisiae* und DSIF p14 ist funktionell gleichbedeutend mit Spt4 aus der Hefe (Wada *et al.*, 1998).

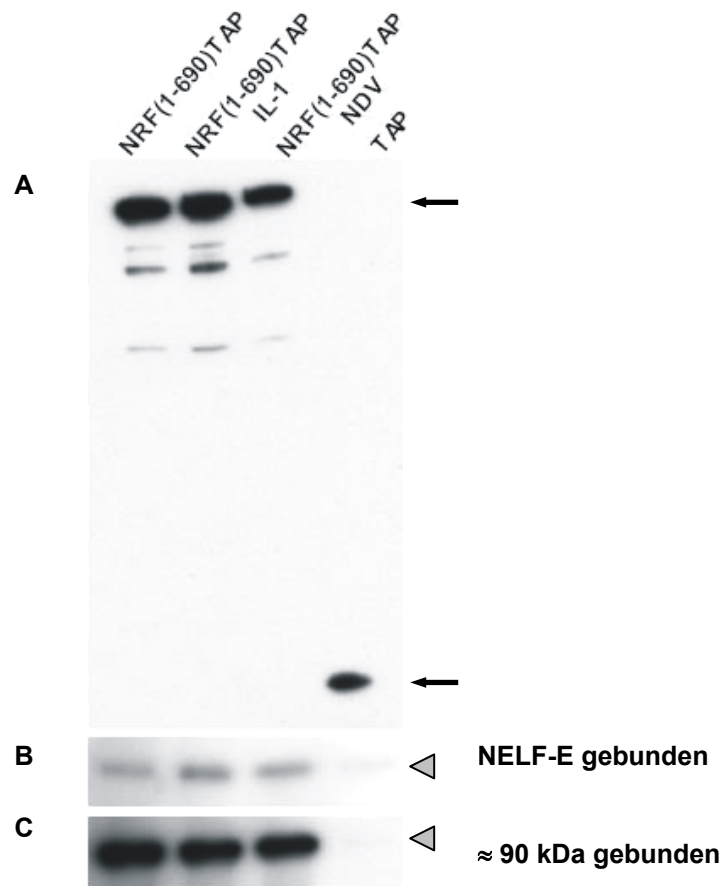


Abb. 2.12. Nachweis der Interaktion von NRF(1-690)TAP im unstimuliertem Zustand und nach Stimulation mit IL-1 und NDV mit NELF-E *in vivo*

(A) Nachweis der Expression von NRF(1-690)TAP und der TAP-Domäne in nichtstimulierten HeLa B-Zellen und in Zellen nach Stimulation mit IL-1 und NDV. Die Detektion erfolgte nach Konzentrationsabgleich und einfacher Aufreinigung über die agarosegekoppelten IgG-Antikörper mittels Western Blot und PAP-Antikörper. Die Proteinbanden von NRF(1-690)TAP sowie des TAPtag sind durch schwarze Pfeile herausgestellt. (B) Nachweis der Interaktion von NELF-E nach zweifacher TAP-Aufreinigung. Für die Detektion wurde ein monoklonaler Antikörper gegen NELF-E aus der Maus verwendet (Kooperation mit Handa *et al.*). Die entsprechenden Proteinbanden sind durch ein graues Dreieck markiert. (C) Zusätzliche Detektion einer Proteinbande, die bei ungefähr 90 kDa lag mit einem anti-NELF-E-Antikörper. Die Höhe der Proteinbanden ist durch ein graues Dreieck hervorgehoben.

Für die Versuche wurde das vollständige NRF(1-690)TAP, welches in nichtstimulierten HeLa B-Zellen und in Zellen nach IL-1- bzw. NDV-Stimulation exprimiert wurde, sowie die TAP-Domäne als Negativkontrolle eingesetzt.

Aus der **Abb. 2.12. (B)** geht hervor, dass NELF-E spezifisch an das vollständige NRF(1-690)TAP gebunden vorlag. Dieses war unabhängig von der Stimulation. Eine unspezifische Interaktion von NELF-E mit der TAP-Domäne allein war schwach.

Wie **Abb. 2.12. (C)** zeigt, war durch Gebrauch des monoklonalen anti-NELF-E-Antikörpers eine weitere Proteinbande bei ungefähr 90 kDa nachweisbar. Hierbei handelte es sich ebenfalls um eine spezifische Interaktion mit NRF(1-690)TAP, da eine Bindung an die TAP-Domäne allein nicht detektiert wurde. Das Molekulargewicht der Proteinbande könnte auf ein Homodimer aus zwei NELF-E Proteinen oder auf ein Heterodimer aus einem NELF-E und einer anderen Komponente von NELF zurückzuführen sein. Gegen diese Vermutung würde jedoch sprechen, dass die Versuche ausschließlich mit einer denaturierenden Polyacrylamidgelelektrophorese (s. 4.2.2.3.) durchgeführt wurden. Es ist wahrscheinlich, dass Proteinkomplexe zerstört wurden und kein Nachweis von intakten Dimeren erfolgen konnte.

Hierbei kann von einer als gleichmäßig angenommenen Konzentration der Zell-extrakte ausgegangen werden. So ist die Menge an p65 zu Beginn der Aufreinigung - unter Berücksichtigung geringfügiger Variationen - je Versuchsansatz gleich. Zudem zeigen hier nicht dargestellte Versuche, dass eine gleichmäßige Konzentration von p65 je Ansatz mit einer als gleich anzusehenden Konzentration von NELF-E in jedem separaten Zelllysate korreliert.

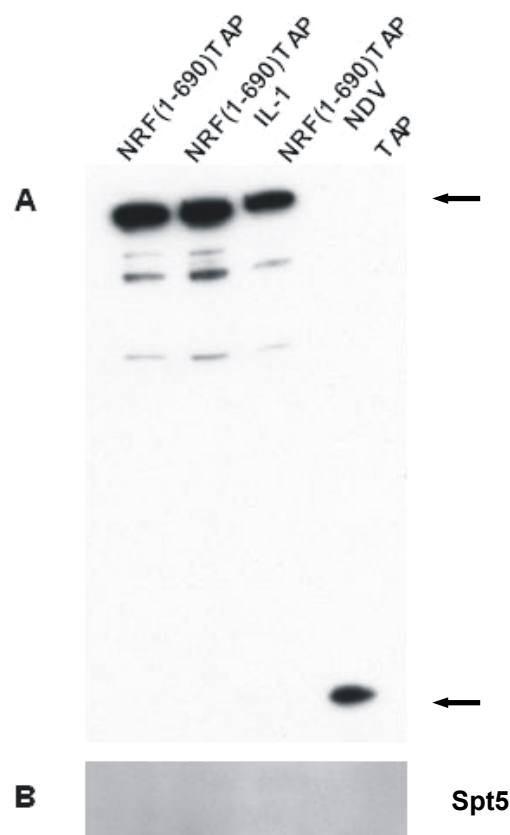


Abb. 2.13. Untersuchung der Interaktion von NRF(1-690)TAP im nichtstimuliertem Zustand und nach Stimulation mit IL-1 und NDV mit Spt5 *in vivo*

(A) Detektion der Expression von NRF(1-690)TAP und der TAP-Domäne in unstimuliert belassenen HeLa B-Zellen und in Zellen nach Stimulation mit IL-1 und NDV. Der Nachweis erfolgte durch Western Blot und PAP-Antikörper nach Konzentrationsabgleich und einfacher Aufreinigung über das Protein A der TAP-Domäne. Die einzelnen Proteinbanden sind durch schwarze Pfeile markiert. **(B)** Untersuchung der Interaktion von NRF(1-690)TAP mit Spt5 nach zweifacher TAP-Aufreinigung. Hierfür wurde ein polyklonaler anti-Spt5-Antikörper aus dem Kaninchen eingesetzt.

Neben der Interaktion von NRF mit NELF-E wurde die Bindung von Spt5 (DSIF p160) an NRF(1-690)TAP vor und nach Stimulation untersucht. Für die Bindungsversuche wurden bereits für die Interaktionsuntersuchungen mit NELF-E verwendete PVDF-Membranen eingesetzt.

Wie **Abb. 2.13. (B)** zeigt, lag Spt5 weder an NRF(1-690)TAP aus nichtstimulierten Zellen noch aus Zellen, die zuvor mit IL-1 oder NDV stimuliert wurden, gebunden vor. Aus diesem Ergebnis geht hervor, dass Spt5 bzw. DSIF p160 voraussichtlich nicht mit NRF interagiert.

2.4. Eingrenzung der Interaktionsdomäne von NRF und NF- κ B (p65) *in vivo*

In 2.2. wurde dargestellt, dass durch die TAP-Aufreinigungsmethode die Interaktion von NRF-TAP-Fusionsproteinen mit NF- κ B (p65) *in vivo* bestätigt werden konnte. Dabei wurde in 2.2.1. gezeigt, dass die C-terminale Deletion von NRF(1-380)TAP zu NRF(1-149) zu einem Verlust der Bindung von p65 an NRF führte. Es kann angenommen werden, dass eine minimale Interaktionsdomäne auf NRF in einem Bereich von Aminosäure 149-380 lokalisiert ist.

2.4.1. Eingrenzung der Interaktionsdomäne auf NRF

Basierend auf diesen Überlegungen wurde die Interaktionsdomäne auf NRF weiter eingegrenzt. Hierfür wurden ebenfalls Ergebnisse aus Interaktionsuntersuchungen von auf einer Cellulosemembran immobilisierten NRF-Peptiden herangezogen (persönliche Mitteilung von M. Nourbakhsh). Die Peptide wiesen eine Sequenz von je 15 Aminosäuren auf und die Aminosäuresequenz eines angrenzenden Peptids war um drei Aminosäuren N- bzw. C-terminal verschoben. Diese Membran wurde mit *in vitro* exprimiertem und radioaktiv markiertem p65 inkubiert, wobei die detektierten Signale auf die Bereiche von NRF hindeuteten, die mit p65 interagierten.

Auf Grundlage dieser Kenntnisse wurde der Vektor pcDNA3NRF1793TAPred1mut konstruiert, der für eine begrenzte Region auf NRF, die die Aminosäuren 204-308 umschließt, kodierte.

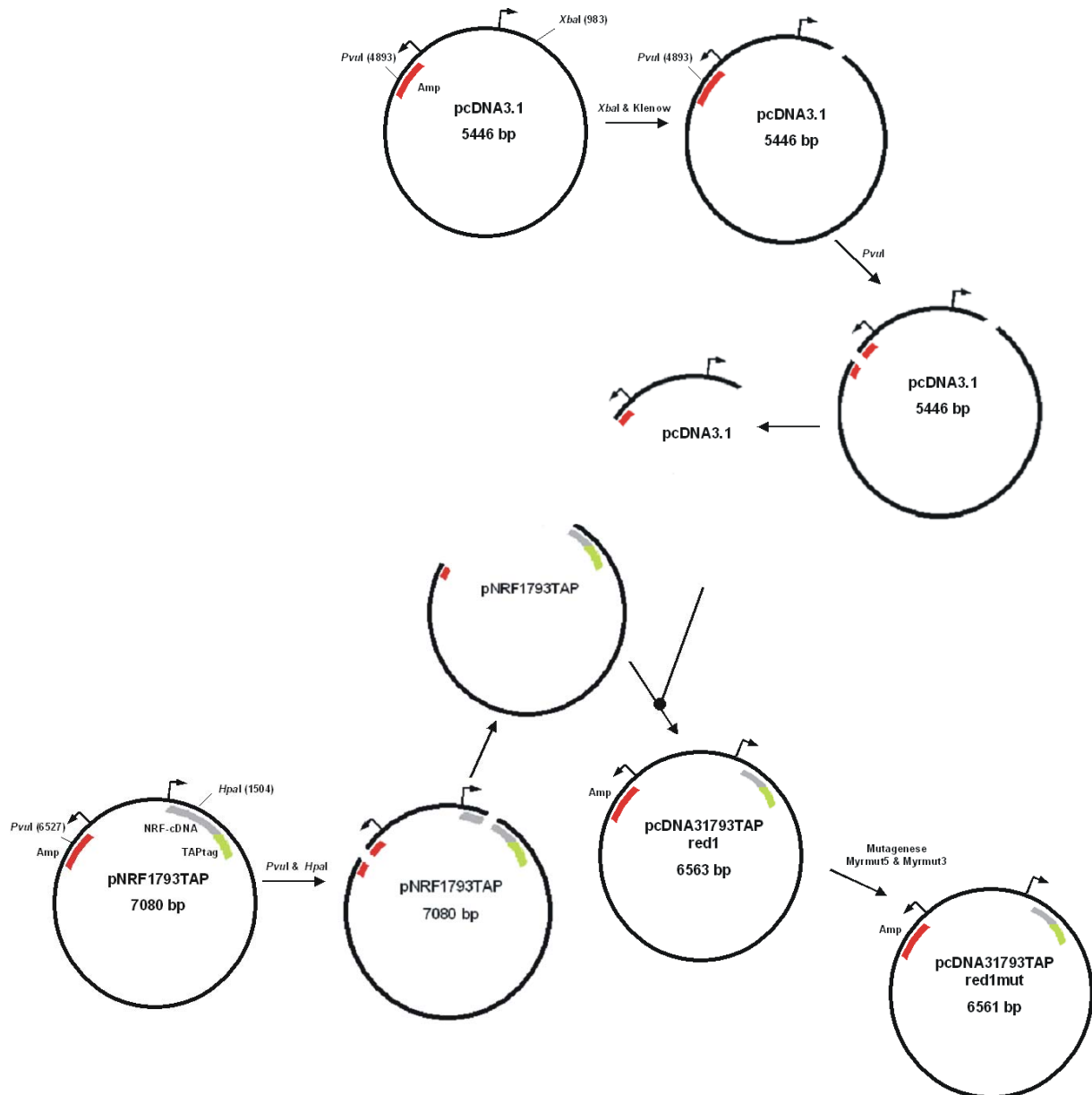


Abb. 2.14. Schematische Darstellung der Klonierung des Vektors pcDNA3NRF1793TAPred1mut

Hierfür wurde der Vektor pcDNA3.1, der als Ausgangsplasmid für die NRF-TAP- bzw. TAP-Konstrukte fungierte, mit dem Restriktionsenzym *XbaI* geschnitten (s. 4.2.4.5. B). Die Schnittstelle wurde anschließend mittels Klenowenzym aufgefüllt. Nachfolgend wurde ein weiterer Restriktionsverdau mit *PvuII* durchgeführt. Parallel wurde der Vektor pNRF 1793TAP, der für NRF(1-380)TAP kodierte (grau), mit *HpaI*

sowie *PvuI* geschnitten. Nach diesem Restriktionsverdau wurde das kleinere Fragment von pcDNA3.1 und das größere aus pNRF1793TAP ligiert (4.2.4.6.). Das resultierende Konstrukt pcDNA3NRF1793TAPred1 enthielt ein Stoppkodon unmittelbar nach der ersten Schnittstelle für *XbaI* nach dem Transkriptionsstart. Aus diesem Grund konnte das Plasmid nicht für die Expression des Proteins NRF(204-308)TAP in HeLa B-Zellen eingesetzt werden. Es folgte eine Mutagenese (s. 4.2.4.7.) mit den Primern Myrmut5 und Myrmut3 (s. 4.1.8.), um dieses Stoppkodon zu eliminieren. Das entstandene Konstrukt pcDNA3NRF1793TAPred1mut, was für NRF(204-308)TAP kodierte, konnte anschließend für die weiteren Versuche verwendet werden.

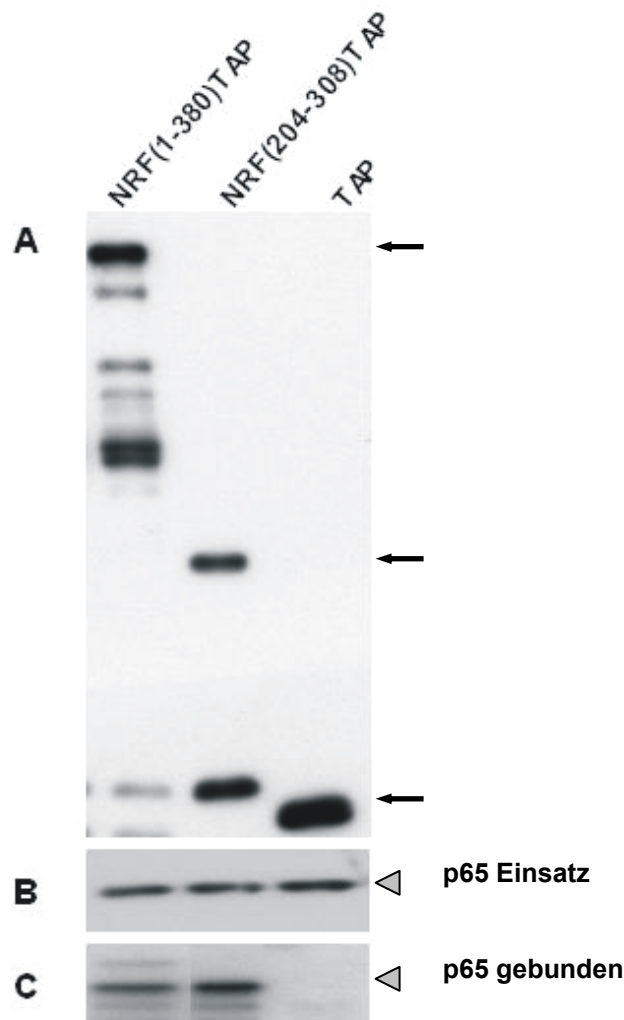


Abb. 2.15. Nachweis der Interaktion von p65 mit NRF(204-308)TAP *in vivo*

(A) Detektion der Expression von NRF(1-380)TAP, NRF(204-308)TAP und des TAPtag nach dem ersten Aufreinigungsschritt (IgG-Antikörper) mittels Western Blot und PAP-Antikörper. Die einzelnen Proteinbanden sind durch schwarze Pfeile hervorgehoben. **(B)** Untersuchung der Konzentration von endogenem p65 in den jeweiligen Transfektionsansätzen vor der TAP-Aufreinigung. Der Nachweis erfolgte mittels anti-p65-Antikörper. Die p65-Proteinbanden sind durch ein graues Dreieck markiert. **(C)** Ermittlung des mit

NRF(1-380)TAP und NRF(204-308)TAP interagierenden p65. Hierfür wurde ein monoklonaler Antikörper gegen p65 eingesetzt. Ebenfalls sind die entsprechenden Proteinbanden mit einem grauen Dreieck markiert.

Um die Interaktion dieses minimalen NRF(204-308)TAP mit endogenem p65 *in vivo* zu untersuchen, wurden der Vektor pcDNA3NRF1793TAPred1mut und zum Vergleich das Plasmid pNRF1793TAP transient in HeLa B-Zellen transfiziert (s. 4.2.1.3.). Als Negativkontrolle wurde die TAP-Domäne allein exprimiert. Die anschließende TAP-Aufreinigung wurde, wie in 2.1.3. beschrieben, durchgeführt.

In **Abb. 2.15. (A)** ist NRF(1-380)TAP, das minimale NRF(204-308)TAP sowie die TAP-Domäne nach der ersten Aufreinigung dargestellt. Die Anfangskonzentration von endogenem p65 konnte in den drei Ansätzen als äquivalent angesehen werden (s. **Abb. 2.15. B**).

Wie **Abb. 2.15. (C)** zeigt, interagierte endogenes p65 mit NRF(1-380)TAP und mit dem minimierten NRF(204-308)TAP. Somit ist der Bereich auf NRF, der die Aminosäuren 204-308 umschließt, für die Interaktion mit p65 ausreichend. Er kann als eine minimale Interaktionsdomäne beschrieben werden. An dieser Stelle wird darauf hingewiesen, dass diese Ergebnisse als Grundlage für die Synthese inhibitorischer Peptide dienen. Auf diese Versuche wird in 2.5. näher eingegangen.

Um die identifizierte minimale Bindedomäne von NRF auf Interaktion mit NELF-E zu untersuchen, wurde in einem weiteren Versuch ein bereits verwendeter Western Blot benutzt (s. 4.2.2.4). Anschließend erfolgte die Überprüfung der Bindung von NELF-E an NRF(1-380)TAP und an NRF(204-308)TAP.

Wie **Abb. 2.16. (B)** zeigt, interagierte NELF-E mit NRF(1-380)TAP und mit NRF(204-308)TAP. Somit konnte die minimale Interaktionsdomäne auf NRF für die Interaktion als ausreichend betrachtet werden. Die Relevanz dieses Bereichs auf NRF für die Interaktion mit Komponenten der Transkriptionsmaschinerie wird durch die in diesem Kapitel dargestellten Daten unterstrichen, da nicht nur p65, sondern auch NELF-E spezifisch mit dem minimierten NRF gebunden vorlag.

Wie aus der Menge an p65 hervorgeht (s. **Abb. 2.15. (B)**), kann hier von gleich konzentrierten Zellextrakten je Ansatz zu Beginn der Aufreinigung ausgegangen werden. In 2.3.3. ist ausgeführt, dass hierdurch auch die Konzentration von NELF-E pro Ansatz als gleich angesehen werden.

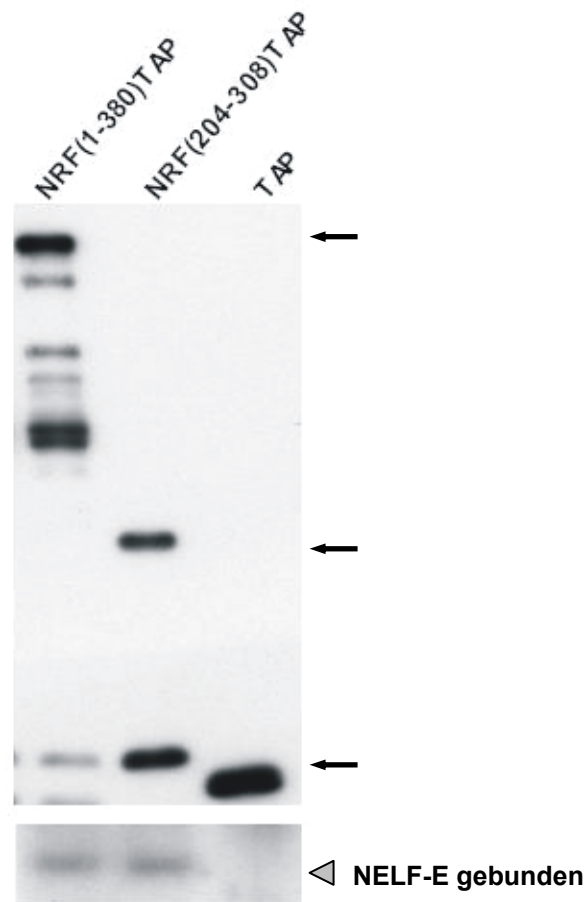


Abb. 2.16. Nachweis der Interaktion von NRF(204-308)TAP mit NELF-E *in vivo*

(A) Nachweis der Expression von NRF(1-380)TAP, NRF(204-308)TAP und der TAP-Domäne in HeLa B-Zellen. Die Detektion erfolgte nach Konzentrationsabgleich und einfacher Aufreinigung über die agarosegekoppelten IgG-Antikörper mittels Western Blot und PAP-Antikörper. Die Proteinbanden von NRF(1-380)TAP, NRF(204-308)TAP sowie des TAPtags sind durch schwarze Pfeile herausgestellt. **(B)** Detektion der Interaktion von NELF-E mit NRF. Für das Experiment wurde ein monoklonaler Antikörper gegen NELF-E aus der Maus eingesetzt. Die entsprechenden Proteinbanden sind durch ein graues Dreieck gekennzeichnet.

2.4.2. Eingrenzung der Interaktionsdomäne auf NF- κ B (p65)

Neben der Eingrenzung der Interaktionsdomäne auf NRF *in vivo* wurde untersucht, ob sich ein minimierter Bereich auf NF- κ B (p65) nachweisen ließ.

Die NF- κ B Faktoren gehören zu der Rel-Proteinfamilie (s. 1.5.) und stimmen in einem etwa 300 Aminosäuren umfassenden N-terminalen Bereich, der Rel-Homologie-Domäne (RHD), überein (Hayden & Ghosh, 2004; Moynagh, 2005). Die RHD auf p65 umschließt die Aminosäuren 18-306 (Jia *et al.*, 2002).

Es lag die Vermutung nahe, dass dieser unter den NF- κ B Faktoren hochkonservierte Bereich für eine Interaktion mit NRF entscheidend war, zumal durch *in vitro* Versuche NF- κ B Faktoren wie p50, p65, p52 sowie c-Rel mit NRF interagierten (Nourbakhsh & Hauser, 1999).

Im Folgenden werden Untersuchungen der Interaktion von NRF-TAP-Fusionsproteinen mit einem für die Rel-Homologie-Domäne von p65 kodierenden Vektor (p65RHD) vorgestellt.

Eine schematische Zusammenfassung der Konstruktion des Plasmids p65RHD ist in **Abb. 2.17.** dargestellt. Das Ausgangsplasmid p65 (orange) wurde mit den beiden Restriktionsenzymen *Nde*I und *Bam*HI geschnitten. Nach Auffüllen der Schnittstellen mit Klenow-Fragment (s. 4.2.4.5. B) erfolgte die Ligation (s. 4.2.4.6.) an den aufgefüllten Schnittstellen. Das entstandene Plasmid p65RHD kodierte für die Aminosäuren 1-305 auf p65. Das exprimierte Protein p65RHD besaß ein Molekulargewicht von 34 kDa. Die Gene p65 und p65RHD standen unter der Kontrolle eines Promotors des myeloproliferativen Sarkom-Virus (MPSV).

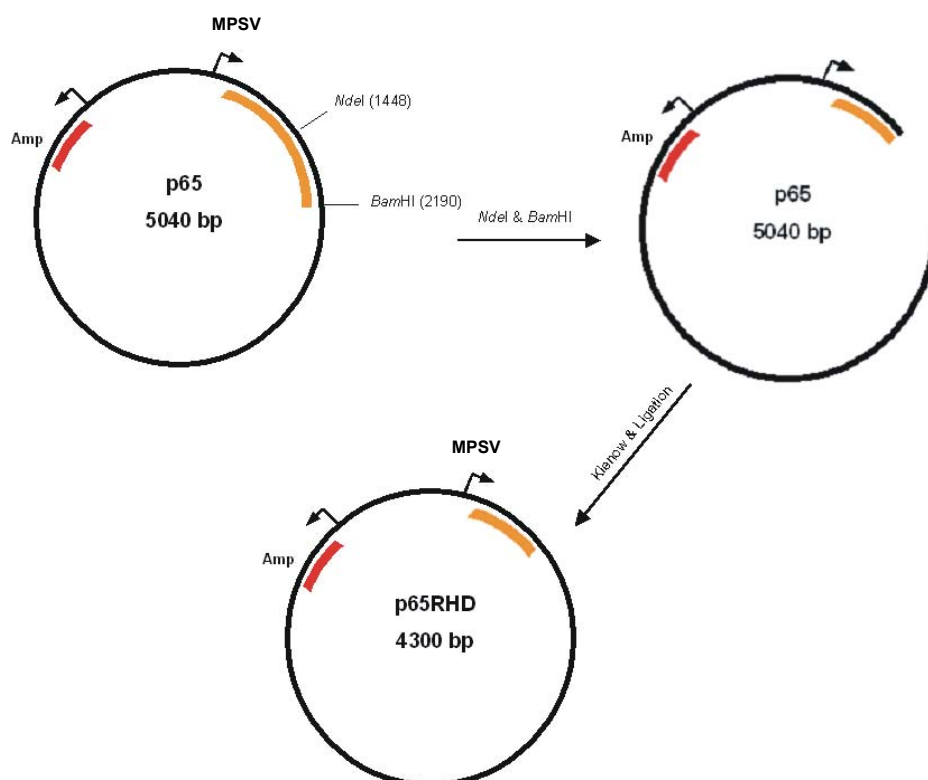


Abb. 2.17. Schematische Darstellung der Konstruktion des für p65RHD kodierenden Vektor aus dem Plasmid p65 (Genbank Nr. M62399)

Für die Interaktionsuntersuchungen von NRF-TAP-Fusionsproteinen mit p65RHD und im Vergleich mit p65 wurden HeLa B-Zellen mit NRF(1-380)TAP und den entsprechenden Vektoren, die für p65 bzw. p65RHD kodierten, kotransfiziert (s. 4.2.1.3.). Anschließend wurde die TAP-Aufreinigungsmethode, wie in 2.1.3. beschrieben, durchgeführt. Für den ersten Aufreinigungsschritt wurden die aus den HeLa B-Zellen gewonnenen Kernfraktionen mit den agarosegekoppelten IgG-Antikörpern inkubiert. Das NRF(1-380)TAP konnte so an die IgG-Antikörper binden. Anschließend erfolgte ein weiterer Inkubationsschritt, in dem das überexprimierte p65 bzw. p65RHD (Cytosolfraktion) an das immunopräzipitierte NRF(1-380)TAP binden konnte. Durch diese in zwei Schritten erfolgte erste Aufreinigung konnte eine verstärkte Bindung von p65RHD an das angereicherte NRF(1-380)TAP vorausgesetzt werden. Die weitere Versuchsdurchführung erfolgte wie in 4.2.2.1. beschrieben.

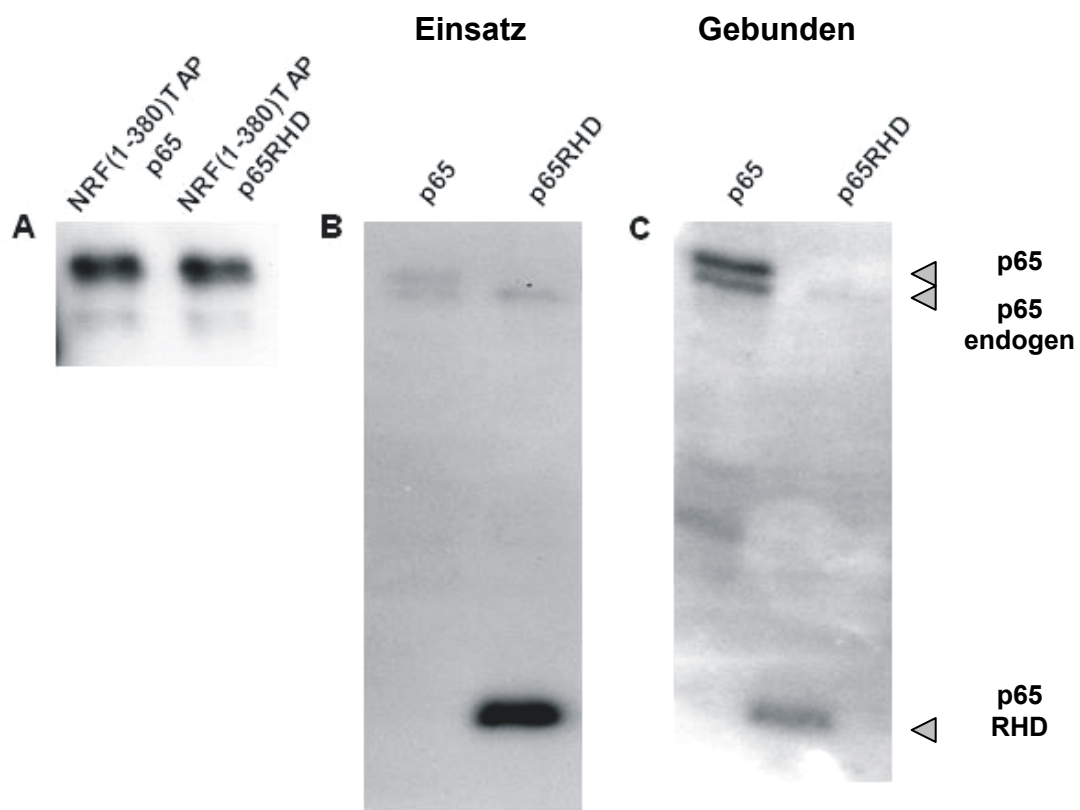


Abb. 2.18. Nachweis der Interaktion von p65RHD mit NRF(1-380)TAP

(A) Detektion der Expression des NRF(1-380)TAP, welches mit p65 (NRF(1-380)TAPp65) und p65RHD (NRF(1-380)TAPp65RHD) kotransfiziert wurde, durch Western Blot und PAP-Antikörper. (B) Transfektionskontrolle des kotransfizierten p65 bzw. p65RHD nach dem ersten Aufreinigungsschritt. Hierfür wurde ein monoklonaler anti-p65-Antikörper verwendet. Die Proteinbanden von p65, von endogenem p65 und von p65RHD sind an der rechten Seite der Abbildung mit grauen Dreiecken markiert. Vor der weiteren Durchführung der Aufreinigung wurde das, nach der Spaltung mittels TEV-Protease im Überstand vor-

komme p65RHD 1:10 in TEV-Protease-Spaltpuffer verdünnt. **(C)** Nachweis der Interaktion von NRF(1-380)TAP mit endogenem p65, mit dem kotransfizierten p65 sowie mit p65RHD.

In **Abb. 2.18.** ist ein Ergebnis der Versuche zu sehen. Wie aus **Abb. 2.18. (C)** hervor- geht, interagierte sowohl das kotransfizierte, das endogene p65 und das p65RHD mit NRF(1-380)TAP.

Aus diesen Daten kann geschlossen werden, dass die Rel-Homologie-Domäne auf p65 für eine Interaktion mit NRF ausreichend ist. Die Interaktionsdomäne auf p65 konnte somit auf den N-terminalen Bereich des Proteins, der die Aminosäuren 1-305 umschließt, begrenzt werden. Auffallend ist, dass das ebenfalls detektierte, endogene p65 ein geringeres Molekulargewicht als das überexprimierte p65 aufwies. Ursache hierfür könnten zusätzliche Sequenzen, wie Spacer, die in den für p65 kodierenden Vektor eingefügt waren und transkribiert sowie translatiert wurden, sein.

Nachfolgend werden Untersuchungen, die die Interaktion von p65RHD mit NRF(204-308)TAP behandelten, dargestellt.

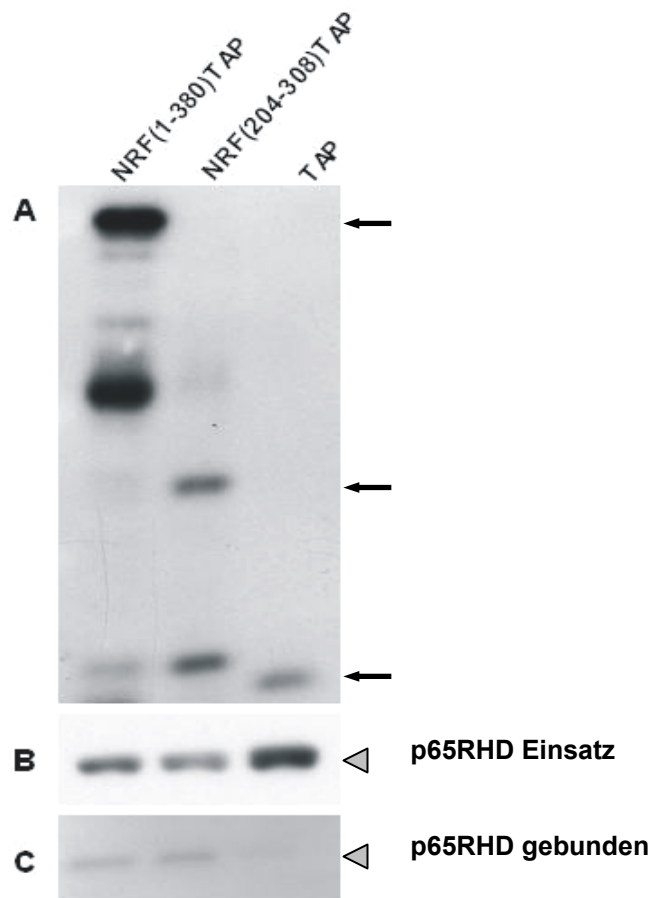


Abb. 2.19. Nachweis der Interaktion von p65RHD mit NRF(204-308)TAP

(A) Untersuchung der Expression von NRF(1-380)TAP, NRF(204-308)TAP und der TAP-Domäne nach Aufreinigung über die agarosegekoppelten IgG-Antikörper. Der Nachweis erfolgte mittels Western Blot und PAP-Antikörper. Die einzelnen Proteinbanden sind durch schwarze Pfeile hervorgehoben. Vor der Weiterführung der TAP-Aufreinigung wurde gebundenes NRF(1-380)TAP 1:3 in IPP-150-Puffer verdünnt. **(B)** Detektion des p65RHD in den Cytosolfractionen der drei Ansätze vor der Aufreinigung. Hierfür wurde ein monoklonaler anti-p65-Antikörper eingesetzt. Das graue Dreieck markiert diese Proteinbanden. **(C)** Nachweis des mit NRF(1-380)TAP und NRF(204-308)TAP interagierenden p65RHD nach zweifacher TAP-Aufreinigung mittels monoklonalen Antikörper gegen p65.

Für die Versuche wurde NRF(204-308)TAP und als Positivkontrolle NRF(1-380)TAP sowie die TAP-Domäne allein und das Plasmid p65RHD in HeLa B-Zellen transient transfiziert (s. 4.2.1.3.). Der erste Aufreinigungsschritt erfolgte wie bei dem zuletzt dargestellten Versuch beschrieben. Der weitere Ablauf wurde anhand des Standardprotokolls, wie in 2.1.3. beschrieben, durchgeführt.

Abb. 2.19. (B) zeigt, dass das überexprimierte p65RHD in den drei Ansätzen in nahezu als gleich anzusehender Konzentration vorlag. Aus **Abb. 2.19. (C)** geht hervor, dass p65RHD sowohl mit NRF(1-380)TAP als auch mit NRF(204-308)TAP interagierte. Eine unspezifische Bindung an die TAP-Domäne allein war gering. Das Ergebnis zeigt, dass die Rel-Homologie-Domäne von p65 mit der identifizierten minimalen Interaktionsdomäne auf NRF (s. 2.4.1.) interagierte.

2.5. Inhibition der Interaktion von NRF mit NF- κ B(p65) *in vitro*

Synthetisierte Peptide, die einen Bereich innerhalb der Interaktionsdomäne eines Proteins wiedergeben, können Bindungen inhibieren (Sillerud & Larson, 2005). So konnte, als ein Beispiel, die Interaktion des Proteins NEMO (für: NF-kappa B essential modifier) mit den Komplex aus I κ B Kinasen (IKK) (s. 1.5.1.) durch Peptide aus der NEMO-bindenden Domäne der IKK gehemmt werden (May *et al.*, 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte durch Peptide, die einen Bereich der minimalen p65-Bindungsdomäne auf NRF wiedergaben, die Interaktion mit p65 *in vitro* partiell inhibiert werden.

2.5.1. Herstellung inhibitorischer Peptide

Die in 2.4.1. beschriebene Eingrenzung der Interaktionsdomäne auf NRF diente als Grundlage für die Synthese inhibitorischer Peptide. Außerhalb sowie entlang dieser

minimalen Interaktionsdomäne wurden Peptide mit einer Länge von jeweils 16 Aminosäuren synthetisiert. In der **Tab. 2.2.** sind diese einzeln aufgeführt.

Name	Sequenz
X	H ₂ N - RDI YQD YTQ DSF SIQ D - COOH
A	H ₂ N - LTR CIQ ACK TNP EYI Y - COOH
B	H ₂ N – EIP PAD IPK NKK LLT D - COOH
C	H ₂ N -TGY AGS KNG SRD RAT E - COOH
D	H ₂ N – VVR RKF KHT FGE DLV V- COOH

Tab. 2.2. Bezeichnung und Peptidsequenz der verwendeten inhibitorischen Peptide

Dabei lagen die Peptide A-D innerhalb der minimalen Interaktionsdomäne. Das Peptid X diente als Kontrolle und gab eine Aminosäuresequenz, die sich außerhalb dieses Bereichs befand, wieder.

Die Anordnung der Peptide innerhalb der minimalen Interaktionsdomäne von NRF und ihre Lokalisation entlang der Aminosäurepositionen 100-300 auf NRF sind in **Abb. 2.20** zu sehen.

A

```

TTA ACT CGT TGT ATT CAG GCG TGT AAG ACA AAT CCT GAG TAT ATA TAT GCT CCT TTA AAG
L T R C I Q A C K T N P E Y I Y A P L K

GAA ATT CCT CCT GCC GAC ATC CCC AAA AAT AAA AAA CTT CTA ACT GAT GGC TAT GCT
E I P P A D I P K N K K L L T D G Y A

TGT GAA GTT AGA TGC CAA AAT ATC TAC TTA ACT ACA GGT TAT GCT GGC AGC AAG AAT
C E V R C Q N I Y L T T G Y A G S K N

GGG TCC AGG GAT CGA GCT ACA GAG CTA GCT GTA AAA CTC TTG CAG AAA CGT ATT GAA
G S R D R A T E L A V K L L Q K R I E

GTT AGA GTT GTC CGG CGG AAA TTC AAG CAT ACA TTT GGA GAG GAC CTC GTG GTG TGT
V R V V R R K F K H T F G E D L V V C

CAG ATT GGC ATG TCC TCC TAT GAA TTT CCT
Q I G M S S Y E F P

```

B

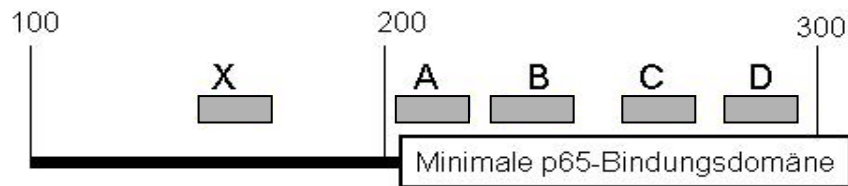


Abb. 2.20. Darstellung der Peptide A-D, deren Aminosäuresequenz einen Abschnitt innerhalb der minimalen Interaktionsdomäne wiedergaben und Abbildung aller eingesetzten Peptidsequenzen entlang der Aminosäurepositionen 100-300 auf NRF

(A) Die Aminosäure- und die entsprechende DNA-Sequenz, die durch das Peptid A wiedergegeben wurde, ist rot hervorgehoben. Die Aminosäure Leucin (L) liegt außerhalb dieser minimalen p65-Bindungsdomäne. Aus diesem Grund ist sie kursiv geschrieben. Die Aminosäuresequenzen und die DNA-Sequenzen, die den Peptiden B-D entsprachen, sind blau (Peptid B), grün (Peptid C) und gelb (Peptid D) herausgestellt. (B) Schematische Wiedergabe der Position der gewählten Peptidsequenzen entlang der Aminosäurepositionen 100-300 auf NRF.

Für die Untersuchungen wurden die einzelnen Peptide in Wasser gelöst. Das Peptid C konnte weder in wässrigen Puffern oder DMSO gelöst werden und wurde nicht für die Versuche verwendet. Die Konzentration der jeweiligen Peptide entsprach 10 mg/ml.

2.5.2. Nachweis der partiellen Inhibition der NRF-p65-Interaktion durch Peptide *in vitro*

Die in 2.5.1. dargestellten Peptide wurden für Versuche, die die Bindung von p65 an NRF zumindest teilweise verhindern sollten, eingesetzt.

In **Abb. 2.21.** sind beispielhaft zwei separate Versuchsansätze, die eine teilweise Blockade der NRF-p65-Bindung zeigen, abgebildet.

NRF(1-380)TAP wurde transient in HeLa B-Zellen transfiziert (s. 4.2.1.3.). Entsprechend der Zahl der zu testenden Peptide wurden gleiche Transfektionen durchgeführt. Demzufolge wurden für den Versuch, der in **Abb. 2.21. (A)** dargestellt ist, parallel vier Transfektionen, für die Untersuchung in **Abb. 2.21. (B)** fünf Transfektionen durchgeführt. Aus den transfizierten Zellen wurden Kern- und Cytosolfaktionen gewonnen. Die einzelnen Fraktionen wurden anschließend separat gemischt und erneut auf vier bzw. fünf Aliquots aufgeteilt. Durch dieses Mischen konnten Schwankungen in der Transfektionseffizienz und dem Proteingehalt pro

Ansatz vermieden werden. Zu den einzelnen Aliquots der Kern- und Cytosolfractionen wurden 5 μ g, 20 μ g und 40 μ g Peptid gegeben. Bei einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 1,8 kDa pro Peptid lag die eingesetzte Konzentration nach Zugabe von 5 μ g-40 μ g bei ungefähr 15 μ M-120 μ M. Das entsprach einem 500-2000fachen Überschuss an Peptid in Bezug auf die geschätzte Konzentration an NRF(1-380)TAP im Lysat. Der Gehalt an NRF(1-380)TAP pro Lysat wurde mit ungefähr 500 ng (etwa 6 pmol \approx 30 nM) angenommen. Durch die Gabe von Peptid im Überschuss konnte eine Wechselwirkung von NRF mit p65 wirksam inhibiert werden. Zudem musste vorausgesetzt werden, dass die Peptid-Fragmente, die ausschließlich einen Bereich der p65-Bindungsdomäne abdeckten, mit p65 schlechter interagierten als die vollständige Domäne.

Nach Zufügen der jeweiligen Peptide zu den Kern- und Cytosolfractionen erfolgte die TAP-Aufreinigung (s. 4.2.2.1.). Gebundenes p65 wurde im Western Blot (s. 4.2.2.4.) detektiert. Dabei war zu Beginn der Versuchsdurchführung die Konzentration von p65 je Ansatz als gleich nachgewiesen worden (Daten nicht dargestellt).

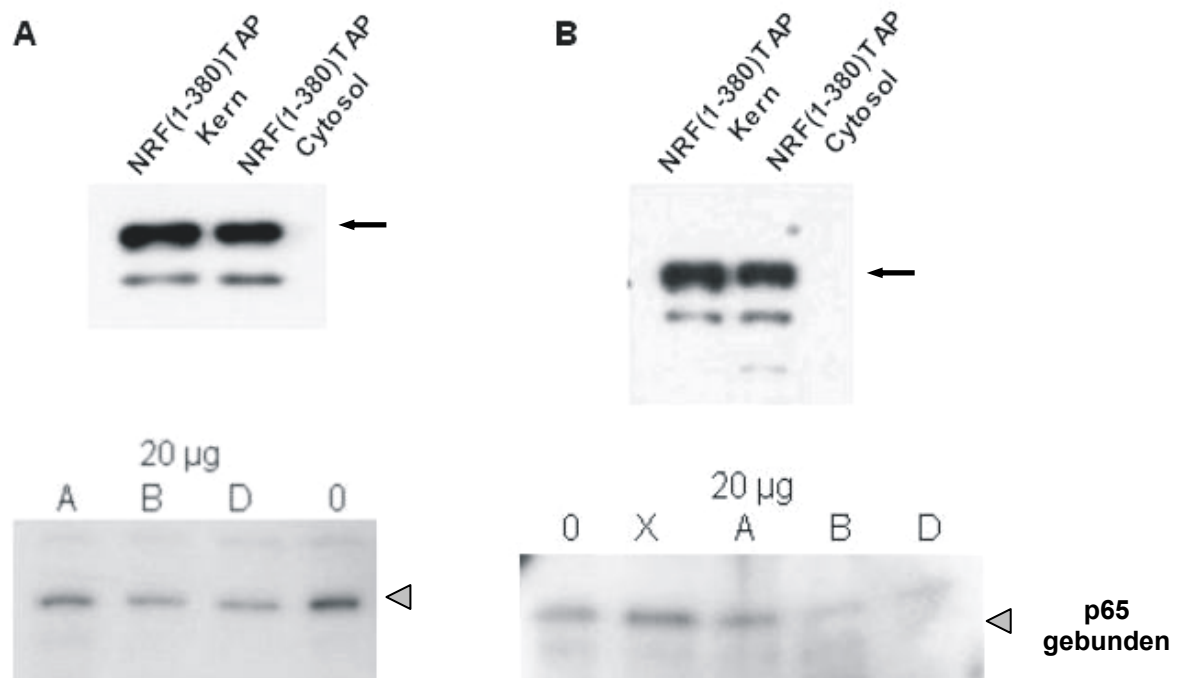


Abb. 2.21. Nachweis der partiellen Inhibition der NRF-p65-Interaktion durch Peptide

(A) Detektion der partiellen Inhibition der Bindung von p65 an NRF durch synthetisierte Peptide. Im oberen Bildteil der Abbildung ist der Nachweis der Expression des NRF(1-380)TAP aus den Kern- und Cytosolfractionen von HeLa B-Zellen zu sehen. Der Nachweis erfolgte mittels Western Blot und PAP-Antikörper. Die TAP-Aufreinigung wurde in Gegenwart von 20 μ g Peptid (A, B, D) bzw. ohne Peptid (0) durchgeführt. Nach zweifacher Aufreinigung wurde das je Ansatz gebundene p65 detektiert (unterer Bildteil). (B) Separate

Transfektionen für den Nachweis der teilweisen Inhibition der NRF-p65-Interaktion durch inhibitorische Peptide. Im oberen Bildteil ist die Expression des NRF(1-380)TAP aus der Kern- und Cytosolfraktion abgebildet. Auch hier erfolgte der Nachweis mittels PAP-Antikörper. Der untere Bildteil zeigt die Detektion von gebundenem p65 pro Ansatz. Die TAP-Aufreinigung erfolgte mit je 20 µg Peptid (X, A, B, D) und ohne Peptid (0). In der Abbildung sind die Proteinbanden der Kern- und Cytosolfractionen von NRF(1-380)TAP durch schwarze Pfeile markiert. Gebundenes p65 ist durch graue Dreiecke hervorgehoben.

Aus **Abb. 2.21. (A)** geht hervor, dass das Peptid A, im Vergleich zu dem Ansatz ohne Peptid (0), die Interaktion von p65 mit NRF partiell inhibierte. Die Menge an gebundenen p65 nahm ab. Die Verminderung der Interaktion von p65 an NRF(1-380)TAP trat nicht in der Stärke auf, wie dieses nach Zugabe von Peptid B und D beobachtet werden konnte (**Abb. 2.21. (A) und (B)**). Das Peptid X, welches als Kontrolle verwendet wurde, übte keinen inhibierenden Einfluss auf die Interaktion von NRF mit p65 aus (**Abb. 2.21. (B)**). Da es eine Peptidsequenz von NRF außerhalb der minimalen Bindungsdomäne abdeckte, wurde dieses Ergebnis erwartet.

Die hier dargestellten Effekte sind zum Teil nur gering, dennoch waren nach mehrfacher Durchführung der Versuche ähnliche Resultate feststellbar. Da die Inhibition der Bindung durch die einzelnen Peptide kompetitiver Natur war, war die detektierte Wirkung stark von der Transfektionseffizienz und somit von der Konzentration an NRF und p65 abhängig. Aus diesem Grund traten von Transfektion zu Transfektion Variationen in der Effizienz der Inhibition der eingesetzten Peptide auf.

2.6. Eingrenzung der DNA-Bindungsdomäne von NRF *in vivo*

Wie in der Einleitung beschrieben (s. 1.6.), verfügt NRF über eine DNA-bindende Domäne (DBD). Aus der Literatur geht hervor, dass sich diese Domäne über die Aminosäuren 296-388 von NRF erstreckt (Nourbakhsh & Hauser, 1999). Zudem konnte hier durch Reporterexperimente eine Bindung der DBD allein an das negativ regulatorische Element (NRE) nachgewiesen werden. Dabei wurde mittels GST-NRF-Fusionsproteinen gezeigt, dass NRF keine zusätzlichen nukleären Faktoren für die Bindung an die DNA benötigt.

Im Rahmen dieser Arbeiten sollte die DNA-Bindedomäne von NRF durch Untersuchungen *in vivo* erneut definiert werden. Hierzu wurde die Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) (s. 4.2.1.7.) durchgeführt.

2.6.1. Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Die Chromatin-Immunopräzipitation ist eine Methode, die den direkten Nachweis der Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA im Kontext einer nativen Chromatinstruktur ermöglicht (Hearn *et al.*, 2005).

Sie kann für die Identifikation von spezifischen Bindestellen bestimmter Transkriptionsfaktoren auf dem gesamten Genom herangezogen werden. So konnten mit ChIP in Kombination mit Selektionssystemen aus Hefen neue Zielgene des Tumorsuppressors p53 identifiziert und validiert werden (Hearn *et al.*, 2005). Darüber hinaus wird die ChIP für die Detektion der Bindung eines Proteins bzw. von dessen Deletionsmutanten an bestimmte Bereiche auf der DNA herangezogen. DNA-bindende Domänen (DBD) auf dem untersuchten Protein können so identifiziert und näher definiert werden.

Abb. 2.22. gibt eine Übersicht der Methode der Chromatin-Immunopräzipitation.

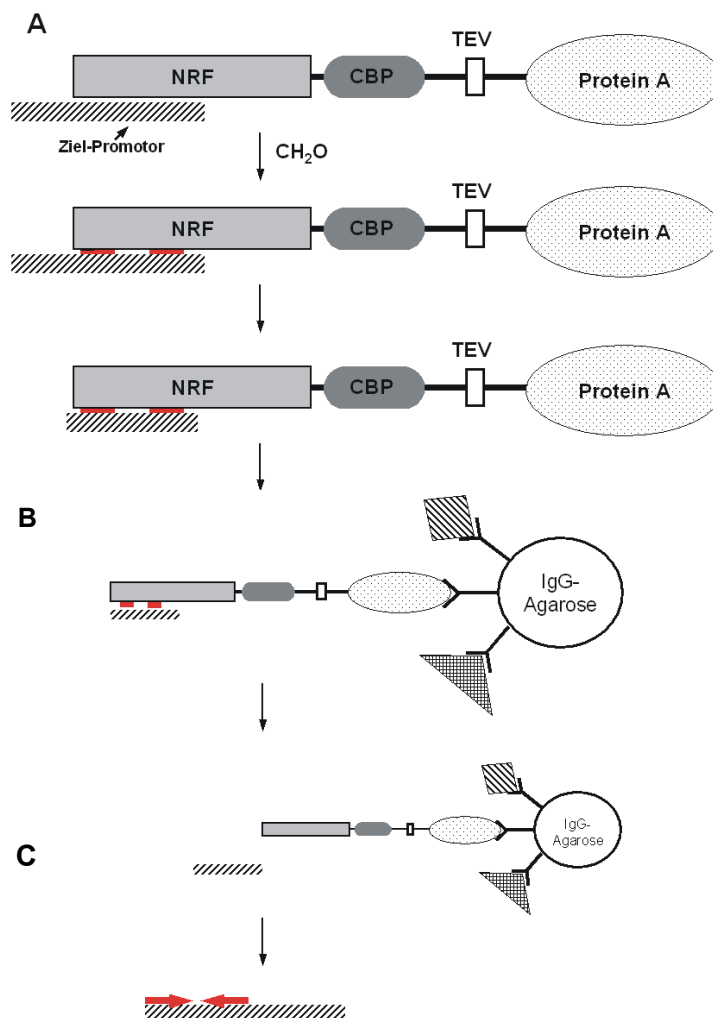


Abb. 2.22. Schematische Darstellung der Chromatin-Immunopräzipitation

(A) Nach Kreuzvernetzung des Chromatins mit interagierenden Proteinen (z.B. den NRF-TAP-Fusionsproteinen) durch Formaldehyd wird die DNA mit Ultraschall geschnitten. (B) Die an DNA gebundenen NRF-TAP-Proteine werden über agarosegegekoppelte IgG-Antikörper von den übrigen Protein-Chromatin-Komplexen isoliert. (C) Nach Proteinverdau wird das Chromatin aufgereinigt. Eine PCR wurde mit spezifischen Primern gefahren.

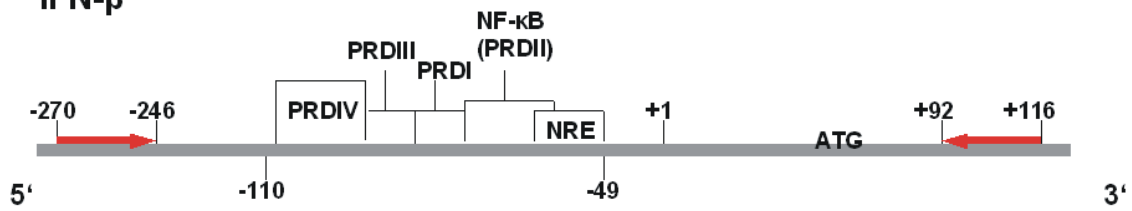
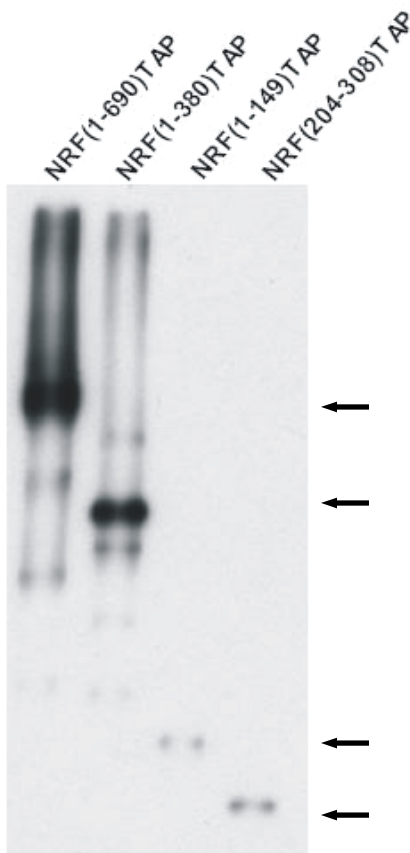
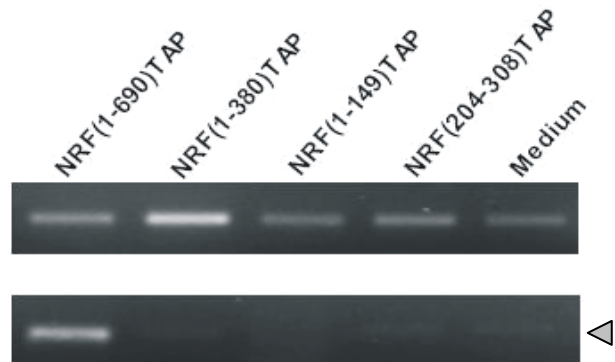
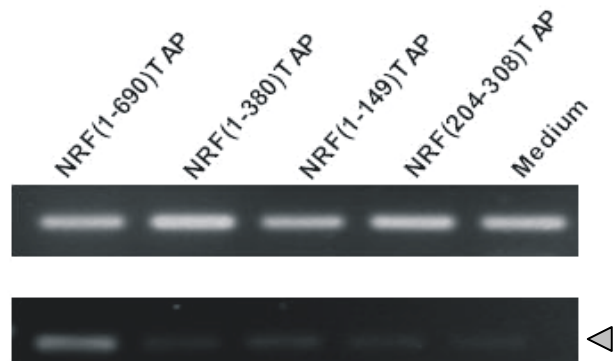
Für diese Versuche wurden HeLa B-Zellen mit NRF-TAP-Fusionsproteinen transfiziert. Für deren Isolation durch Immunopräzipitation wurde das TAPtag der Fusionsproteine genutzt. Der nachfolgende Verdau der Proteine erfolgte durch Zusatz von Proteinase K. Die frei vorliegende DNA wurde aufgereinigt und konnte nachfolgend über PCR (s. 4.2.4.10.) amplifiziert werden.

Aus der Literatur geht hervor, dass NRF an das NRE des Promotors von IFN- β und IL-8 bindet (Nourbakhsh & Hauser, 1999 & Nourbakhsh *et al.*, 2001). Somit wurden diese Promotorbereiche durch spezifische Primer (s. 4.1.8.) amplifiziert und gelelektrophoretisch analysiert (s. 4.2.4.3.).

2.6.2. Nachweis der Bindung von NRF(1-690)TAP an die Promotoren von IFN- β und IL-8 *in vivo*

Für die Untersuchung der DNA-bindenden Eigenschaften von NRF wurden HeLa B-Zellen mit den Vektoren pNRF2722TAP, pNRF1793TAP, pNRF1091TAP (s. 2.1.2.) und dem NRF(204-308)TAP exprimierendem Plasmid pcDNA3NRF1793TAPred1mut (s. 2.4.1.) transfiziert. Die anschließende ChIP wurde, wie in 4.2.1.7. beschrieben, durchgeführt.

In **Abb. 2.23. (A)** ist die Position der eingesetzten Primer entlang der Promotoren von IFN- β bzw. IL-8 schematisch abgebildet. Dabei liegen wesentliche regulatorische Sequenzen in dem amplifizierten Bereich (Collins *et al.*, 1995; Roebuck, 1999). Die detektierten PCR-Fragmente besaßen eine Größe von 386 Basenpaaren (bp) (IFN- β -Promotor) sowie 181 bp (IL-8-Promotor).

A**IFN- β** **IL-8****B****C****IFN- β Promoter****D****IL-8 Promoter****Abb. 2.23. Nachweis der Bindung von NRF(1-690)TAP an die Promotoren von IFN- β und IL-8**

(A) Schematische Darstellung der Position der eingesetzten und für den Promotor von IFN- β (IFNpro5/IFNpro3) bzw. IL-8 (IL8Prom5/IL8Prom3) spezifischen Primer (B) Nachweis der

Expression der einzelnen NRF-TAP-Fusionsproteine im Lysat der HeLa B-Zellen nach Vernetzung durch Formaldehyd. Die Detektion erfolgte mittels Western Blot und PAP-Antikörper. Die jeweiligen Proteinbanden sind durch schwarze Pfeile hervorgehoben. Dabei wurden, um Unterschiede in der Transfektionseffizienz auszugleichen, die Lysate von NRF(1-690)TAP und NRF(1-380)TAP 1:15 bzw. 1:10 in sterilen, deionisierten Wasser verdünnt. **(C)** Nachweis der Bindung von NRF(1-690)TAP an den Promotor von IFN- β über PCR. Dabei geben die, im oberen Bildteil dargestellten Banden, die Konzentration des Gesamtchromatins pro Ansatz vor der Immunopräzipitation wieder. Bei dem als „Medium“ bezeichneten Lysat handelte es sich um untransfizierte HeLa B-Zellen, die als Kontrolle dienten. Im unteren Bildteil sind die amplifizierten DNA-Banden nach Immunopräzipitation mittels IgG-Antikörper abgebildet. Die entsprechende Bande ist durch ein graues Dreieck markiert. **(D)** Nachweis der Bindung von NRF(1-690)TAP an den Promotor von IL-8 (graues Dreieck). Im oberen Bildteil ist die Menge an Gesamtchromatin pro Ansatz zu sehen.

In dem in **Abb. 2.23 (B)** dargestellten Western Blot sind die Proteinbanden der NRF-TAP-Fusionsproteine nicht klar umrissen. Dieser Qualitätsmangel des Western Blots ist auf die vor der Lyse durchgeführte Kreuzvernetzung zurückzuführen. Die Fusionsproteine waren bereits an das Chromatin, mit dem sie interagierten, kovalent gebunden. Aus diesem Grund ist voraussichtlich das Fehlen der nicht klar abgegrenzten Proteinbanden mit dem Vorhandensein von DNA zu erklären. In **Abb. 2.23. (C)** und **(D)** im oberen Bildteil sind die amplifizierten DNA-Banden des gesamten Chromatins pro Ansatz dargestellt. Aus den Ergebnissen geht hervor, dass von einer annähernd vergleichbaren Konzentration je untersuchten Lysats ausgegangen werden kann.

Eine für die NRF-TAP-Fusionsproteine spezifische Isolation der DNA-Protein-Komplexe wurde nach Immunopräzipitation mittels agarosegekoppelten IgG-Antikörpern erzielt. Durch Einsatz der beschriebenen Primer wurde die Interaktion der NRF-TAP-Proteine an die Promotoren von IFN- β und IL-8 untersucht. Wie in **Abb. 2.23. (B)** und **(C)** im unteren Bildteil ersichtlich wird, bindet ausschließlich das vollständige NRF(1-690)TAP an die jeweiligen Promotoren.

Somit kann davon ausgegangen werden, dass der C-terminale Bereich auf NRF, der die Aminosäuren 381-690 umschließt, für die DNA-Bindung an die Promotoren von IFN- β und IL-8 verantwortlich ist.

2.6.3. Nachweis einer verstärkten Bindung von NRF(1-690)TAP an den Promotor von IFN- β nach Stimulation mit NDV *in vivo*

Der in 2.6.2. dargestellte Nachweis der Bindung von NRF(1-690)TAP an den IFN- β -Promotor wurde auf den Einfluss von Stimuli untersucht.

Hierfür wurden die mit NRF(1-690)TAP transfizierten bzw. die untransfiziert belassenen HeLa B-Zellen vor der Formaldehydvernetzung für jeweils eine Stunde mit IL-1 oder NDV stimuliert (s. 4.2.1.4.). Die Zellyse und anschließende ChIP (s. 4.2.1.7.) sowie PCR (s. 4.2.4.10.) erfolgte wie bereits erläutert.

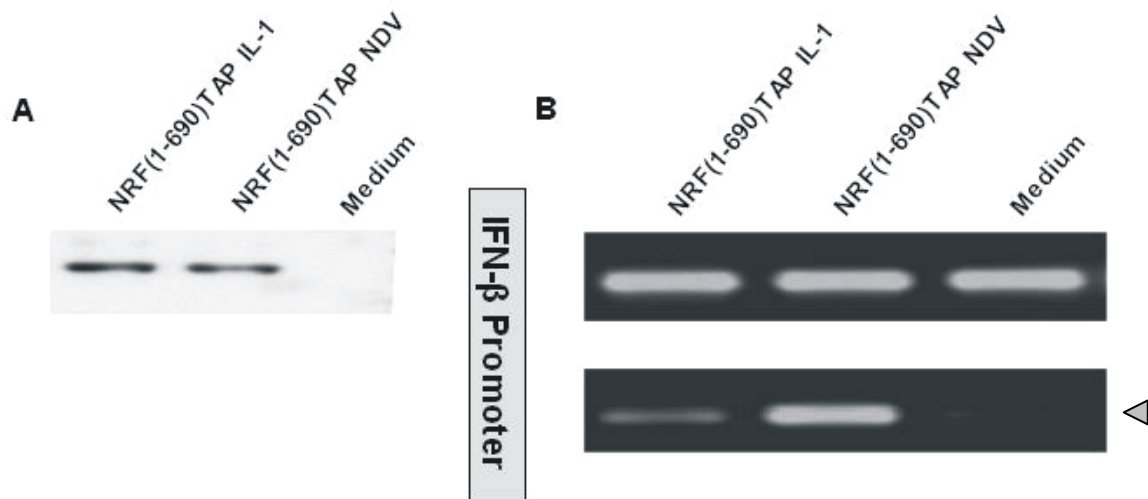


Abb. 2.24. Nachweis einer verstärkten Bindung von NRF(1-690)TAP an den Promotor von IFN- β nach Stimulation mit NDV *in vivo*

(A) Detektion der Expression von NRF(1-690)TAP in HeLa B-Zellen nach der Behandlung der Zellen mit Formaldehyd sowie Stimulation mit IL-1 und NDV. Der Nachweis erfolgte mittels Western Blot und PAP-Antikörper. (B) Im oberen Bildteil der Abbildung ist das Gesamtchromatin je Ansatz nach Amplifikation mit den Primern IFNpro5 und IFNpro3 dargestellt. Im unteren Bildteil sind die nach Immunopräzipitation amplifizierten DNA-Banden zu sehen (graues Dreieck).

Die Lysate der transfizierten HeLa B-Zellen bzw. des Ansatzes aus Zellen, die nicht transfiziert wurden („Medium“), wurden auf Expression von NRF(1-690)TAP überprüft. Die Konzentration der überexprimierten NRF-TAP-Proteine konnte als gleich angenommen werden.

Aus **Abb. 2.24. (B)** geht hervor, dass nach NDV-Stimulation, nicht aber nach Induktion mit IL-1, eine stärkere Bindung von NRF(1-690)TAP an den Promotor von IFN- β festgestellt werden konnte. Dabei konnte das Gesamtchromatin je Ansatz als gleich konzentriert betrachtet werden, was aus dem oberen Bildteil ersichtlich wird.

2.7. Untersuchung der von NRF und p65 abhängigen transkriptionellen Aktivität im Luziferase-Reportersystem

Anhand eines geeigneten Nachweissystems sollte die funktionelle Aktivität von NRF und p65 in HeLa B-Zellen detektiert werden.

Hierfür wurden Reporterexperimente verwendet. Ein Reportersystem basiert im wesentlichen auf einem Reporterplasmid und auf Expressionsvektoren, die für Effektorproteine kodieren (Effektorplasmide). Neben einem minimalen Promotor (TATA-Box) enthält ein Reporterplasmid Bindestellen, an die Transkriptionsfaktoren binden können. Darüber hinaus kodiert es für ein Protein, dessen variierende Konzentration leicht messbar ist. Ein Effektorplasmid enthält die Information eines Fusionsproteins, welches aus dem zu untersuchenden Protein und DNA-Bindungsdomänen aufgebaut ist. Über diese Bindungsdomänen kann das Fusionsprotein an das Reporterplasmid binden und die Aktivität der Transkription beeinflussen.

2.7.1. Gal-Lex-Luziferase-Reportersystem

Das für die Versuche genutzte Reporterplasmid pL6G2Luc enthielt neben sechs LexA-Bindestellen zwei weitere Gal4-Bindestellen. Zudem beinhaltete es Sequenzen, die für Luziferase aus *Photinus pyralis* (Firefly-Luziferase, F-Luc) kodierten. Allgemein ist die Konzentration der exprimierten Luziferase proportional zu der Transkriptionsaktivität. Diese wird von den an das Reporterplasmid bindenden Transkriptionsfaktoren beeinflusst.

Während der Arbeiten wurden als Effektorplasmide Vektoren eingesetzt, die für p65-LexA und Gal4-NRF kodierten. Sie wurden als p65Lex und pGalNRF bezeichnet. Die exprimierten Effektorproteine stellten Fusionsproteine dar, die DNA-bindende Domänen von LexA (*Escherichia coli*) und Gal4 (*Saccharomyces cerevisiae*) trugen. Über diese Domänen konnten die Proteine NRF und p65 an die Promotorregion des Reporterplasmids binden und die Transkription der Luziferase-DNA beeinflussen. Dabei sollte durch Bindung von p65-LexA die Genexpression aktiviert, diese jedoch nach Bindung von Gal4-NRF inhibiert werden.

Für die Etablierung eines geeigneten Reportersystems war es erforderlich, die entsprechenden Plasmide zu konstruieren. Die notwendigen Klonierungen werden nachfolgend beschrieben.

2.7.1.1. Herstellung des Reporterplasmids pL6G2Luc

Die Konstruktion des Reporterplasmids pL6G2Luc ist schematisch **Abb. 2.25.** dargestellt.

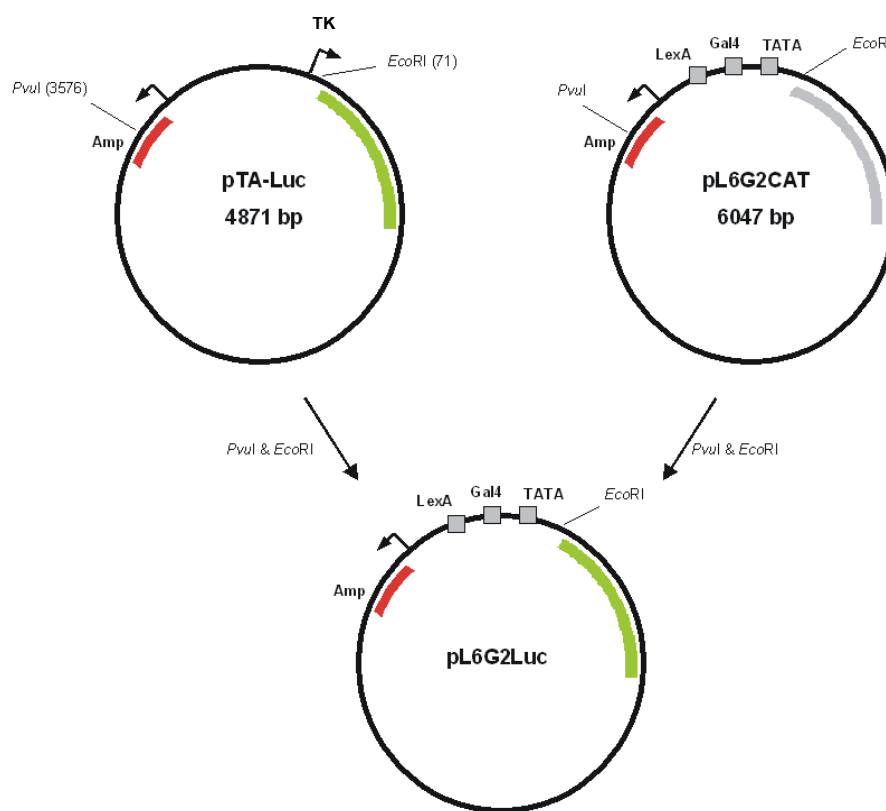


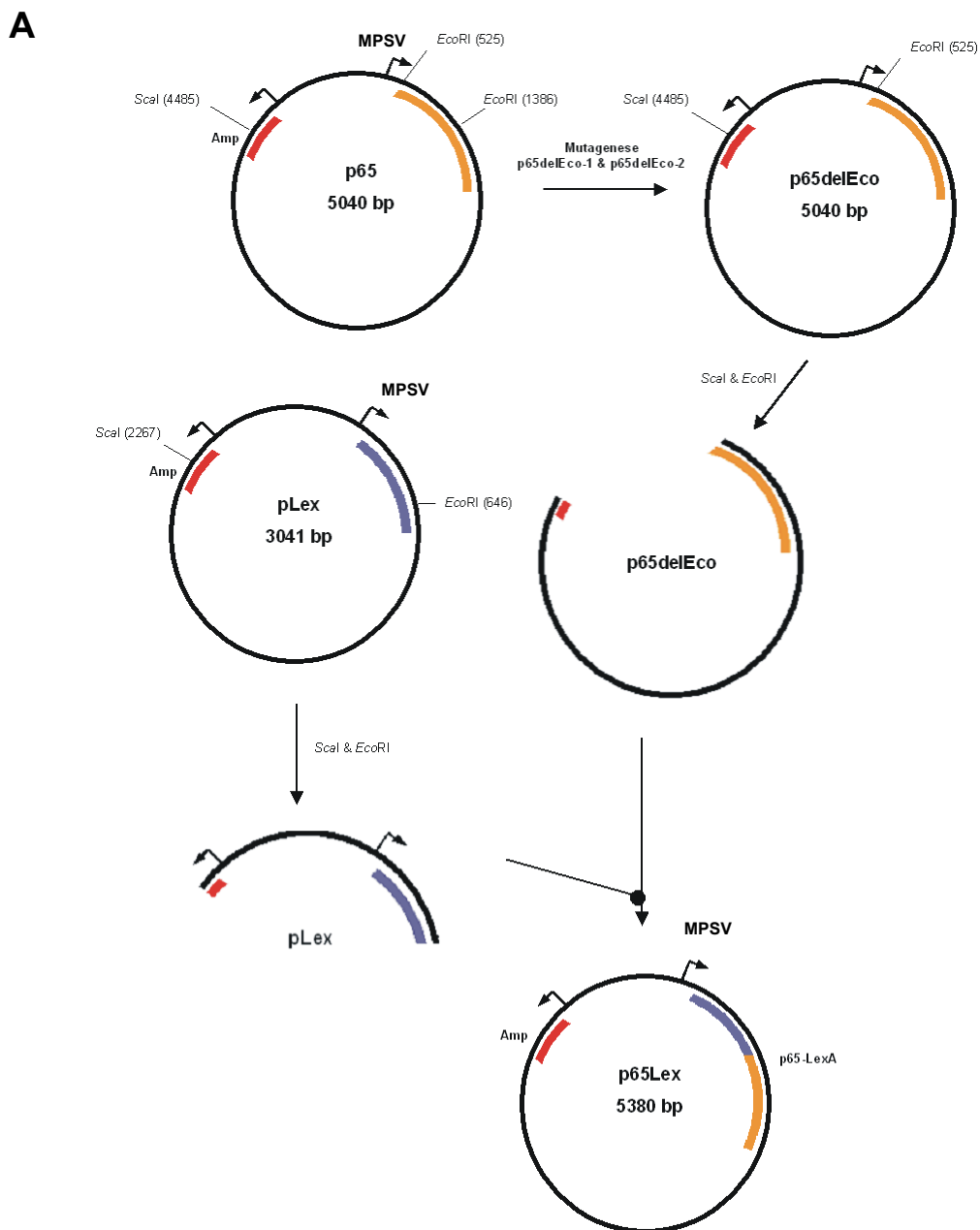
Abb. 2.25. Schematische Darstellung der Konstruktion des Reporterplasmids pL6G2Luc

Hierfür wurden die Plasmide pTA-Luc und pL6G2CAT kloniert. Letzteres enthielt die notwendige Promotorregion sowie das Reportergen Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (CAT) (grau). Das erforderliche Luziferase-Gen wurde durch das Plasmid pTA-Luc (grün) geliefert. Es stand unter der Kontrolle eines Thymidinkinase (TK)-Promotors. Zunächst wurden beide Vektoren mit den Restriktionsenzymen *PvuII* und *EcoRI* geschnitten (s. 4.2.4.5. B). Die Erstellung des Reporterplasmids pL6G2Luc erfolgte durch Einfügen des Fragmentes von pL6G2CAT in das geöffnete pTA-Luc mittels Ligation (s. 4.2.4.6.).

2.7.1.2. Konstruktion der Effektorplasmide p65Lex und pGalNRF

Für die Herstellung von geeigneten Effektorplasmiden wurden die Proteine p65 und NRF mit DNA-bindenden Domänen von LexA und Gal4 fusioniert.

Nachfolgend wird zunächst auf die Klonierung des Vektors p65Lex eingegangen. Das Plasmid stand unter der Kontrolle eines MPSV-Promotors.



B

601- ATT GAA GGG CTG GCG GTT GGG GTT ATT CGC AAC GGC GAC TGG CTG **GAA TTC**
 I E G L A V G V I R N G D W L E F

ACC ATG GAC GAA CTG TTC CCC CTC ATC TTC CCG GCA GAG CCA GCC CAG GCC -702
 T M D E L F P L I F P A E P A Q A

Abb. 2.26. Schematische Abbildung der Herstellung des Effektorplasmids p65Lex sowie Darstellung eines Ausschnittes der Nukleotid- und Aminosäuresequenz des Fusionsbereichs von LexA mit p65

(A) Konstruktion des Vektors p65Lex (B) Ausschnitt aus der Nukleotid- und Aminosäuresequenz des Fusionsbereiches von LexA mit p65. Dabei ist der Sequenzabschnitt von LexA blau hervorgehoben, der von p65 gelb. Die Restriktionsschnittstelle von *EcoRI* ist grau unterlegt.

Schematisch ist die Konstruktion von p65Lex in **Abb. 2.26.** dargestellt. Die Sequenz von p65 (orange) wurde aus dem Plasmid p65 nach Restriktionsverdau mit den Enzymen *ScaI* und *EcoRI* isoliert. Der Vektor enthielt in der für p65 kodierenden DNA jedoch eine weitere *EcoRI*-Schnittstelle. Diese musste vor dem Verdau aus dem Plasmid p65 entfernt werden. Für die Deletion wurde eine Mutagenese (s. 4.2.4.7.) mit den Primern p65delEco-1 und p65delEco-2 (s. 4.1.8.) durchgeführt. Der entstandene Vektor p65delEco enthielt ausschließlich eine Schnittstelle für das Enzym, war aber ansonsten in der Sequenz von p65 nicht verändert. Anschließend wurde das Plasmid pLex, welches für die LexA-DNA-Bindedomäne (blau) kodierte, sowie der Vektor p65delEco mit den Enzymen *ScaI* und *EcoRI* geöffnet. Die p65-DNA wurde nachfolgend in das geschnittene Plasmid pLex ligiert (s. 4.2.4.6.). Der entstandene Vektor p65Lex kodierte für das Fusionsprotein aus p65 und der DNA-bindenden Domäne von LexA.

Das Plasmid pGalNRF kodierte für ein Fusionsprotein, welches die Sequenz für das vollständige NRF (Aminosäure 1-690) und die DNA-bindende Domäne von Gal4 enthielt.

Eine schematische Darstellung der Klonierung dieses Vektors ist in der **Abb. 2.27.** zu sehen. Für die Konstruktion wurden die Vektoren pNRF2722TAP und pGalNRFd2 mit *BamHI* und *NdeI* geschnitten. Während die DNA für das gesamte NRF in dem Plasmid pNRF2722TAP (grau) enthalten war, kodierte pGalNRFd2 (rot) für die Aminosäuren 1-193 des Fusionsproteins GalNRF. Nach Restriktionsverdau wurde die NRF-Sequenz aus pNRF2722TAP in pGalNRF eingefügt. Somit wurde die DNA, die für das Fusionsprotein Gal4-NRF kodierte, unter die Kontrolle eines Promotors

aus den Simeon-Virus-40 (SV-40) gebracht. Das entstandene Effektorplasmid wurde als pGalNRF bezeichnet.

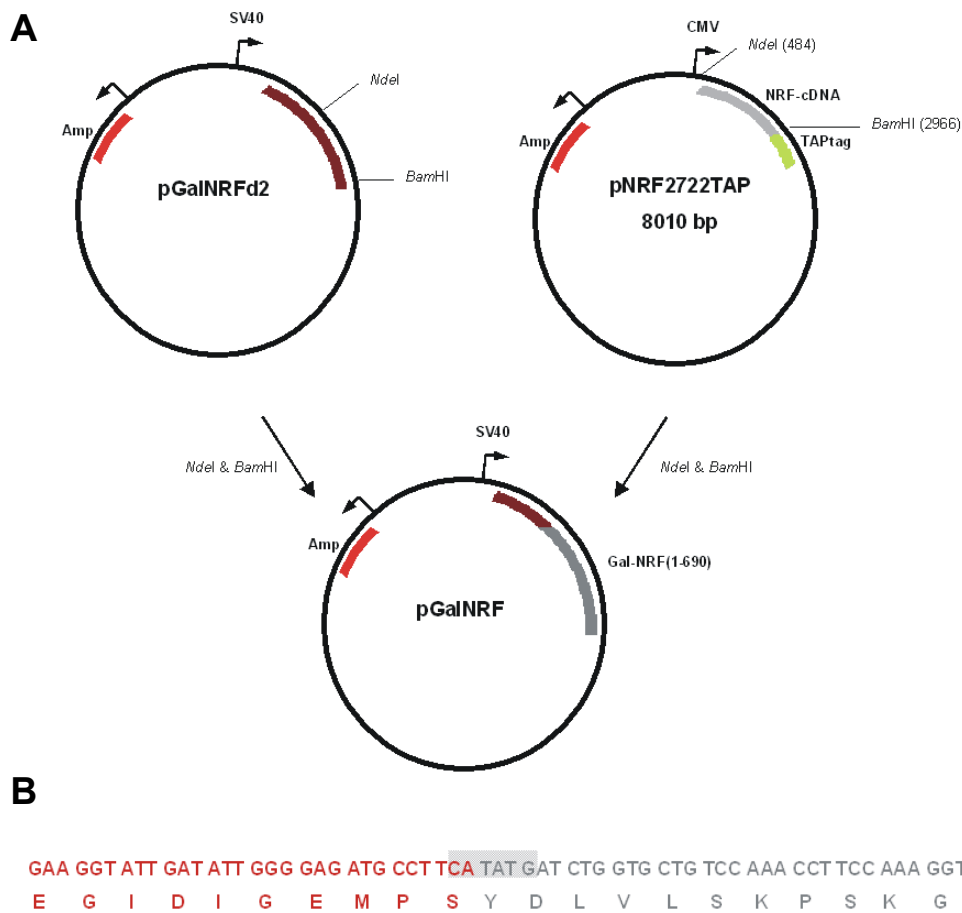


Abb. 2.27. Schematische Zusammenfassung der Herstellung des Effektorplasmids pGalNRF sowie Darstellung eines Ausschnittes der Nukleotid- und Aminosäuresequenz des Fusionsbereichs von Gal4 mit NRF(1-690)TAP
(A) Konstruktion des Vektors pGalNRF **(B)** Ausschnitt aus der Nukleotid- und Aminosäuresequenz des Fusionsbereichs von Gal4 mit dem vollständigen NRF(1-690)TAP. Der Sequenzabschnitt von Gal4 ist rot, der von NRF(1-690)TAP grau hervorgehoben. Die Restriktionsschnittstelle von *NdeI* ist grau unterlegt.

Für die Versuche zur Etablierung des Luziferase-Reportersystems wurde nicht der Vektor pGalNRF, sondern das bereits vorhandene Effektorplasmid pGalNRF1 verwendet. Es kodiert für die Aminosäuren 1-380 auf NRF.

2.7.2. Etablierung des Reportersystems

Die in 2.7.1.1. und 2.7.1.2. beschriebenen Reporter- und Effektorplasmide wurden für die nachfolgenden Untersuchungen eingesetzt. Hierzu war es zunächst notwendig,

das Reportersystem zu etablieren. Wie in 2.7.1. dargestellt, sollte die Transkription der Firefly-Luziferase im Reporterplasmid pL6G2Luc nach Bindung des Fusionsproteins p65-LexA an die DNA-Bindestelle für LexA aktiviert werden. Nach Bindung von Gal4-NRF1 an die entsprechende DNA-Bindestelle sollte die Expression der Luziferase hingegen gehemmt werden.

In einem ersten Versuch wurde die Funktion des zu verwendenden Reportersystems überprüft. Hierzu wurden HeLa B-Zellen transient mit dem Reporterplasmid pL6G2 Luc sowie mit einem weiteren Vektor (pRL-TK) transfiziert (s. 4.2.1.3.). Dieses Plasmid kodierte für Luziferase aus *Renilla muelleri* (Renilla-Luziferase), die unter der Kontrolle eines TK-Promotors stand. Die Luziferaseaktivität konnte bei einer Lichtemission bei 480 nm unabhängig von der der Firefly-Luziferase ermittelt werden und diente als interner Standard. So konnten Schwankungen in der Transfektionseffizienz ausgeglichen werden. Die ermittelten Daten aus den Reporterexperimenten wurden somit auf die Renilla-Luziferaseaktivität normiert.

Neben diesen beiden Plasmiden wurden die Zellen in verschiedenen Ansätzen mit je einem weiteren Vektor pGalNRF1, p65Lex oder pGal4-VP16 kotransfiziert. Das Plasmid pGal4-VP16 kodierte für ein Fusionsprotein aus einer DNA-bindenden Domäne von Gal4 und dem viralen Protein 16 (VP16) aus Herpes simplex. Bei diesem Protein handelte es sich um einen starken Aktivator der eukaryontischen Transkriptionsmaschinerie. Das Fusionsprotein Gal4-VP16 sollte die Transkriptionsaktivität des Reporterplasmids erhöhen. Der Vektor konnte somit als Positivkontrolle eingesetzt werden.

Nach den entsprechenden Transfektionen wurden die HeLa B-Zellen lysiert (s. 4.2.1.6. B). Anschließend wurde die Aktivität der Firefly- und Renilla-Luziferase ermittelt (s. 4.2.2.2.). Das emittierte Lumineszenzlicht der Firefly-Luziferase wurde bei einer Wellenlänge von 562 nm detektiert. Generell ist die gemessene Lichtemission proportional zu der Konzentration der Luziferase und die Menge an Luziferase im Lysat ist proportional zu der Stärke der Genexpression der Firefly-Luziferase-DNA des Reporterplasmids. Bei den Versuchen stand pL6G2Luc unter der Kontrolle des minimalen Promotors, der die entsprechenden DNA-Bindestellen für Gal4 und LexA enthielt. Die Transkription der Firefly-Luziferase wurde somit von den Gal4- bzw. LexA-Fusionsproteinen beeinflusst. Die gemessene Lumineszenz war ein indirektes Maß für den Einfluss der Transkriptionsfaktoren p65 und NRF auf

die Genexpression. Die Ergebnisse des beschriebenen Experimentes sind in der **Abb. 2.28.** zu sehen.

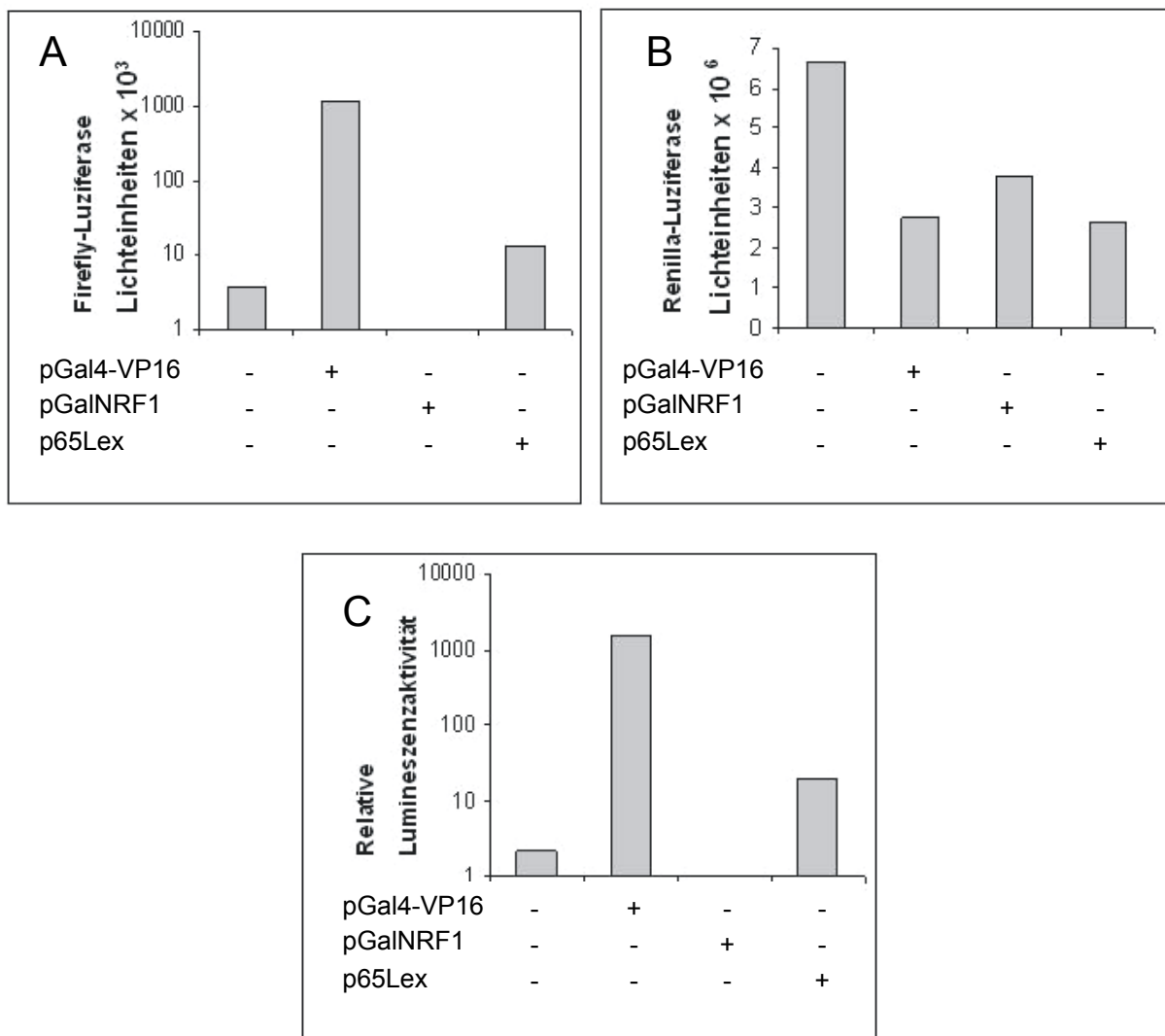


Abb. 2.28. Etablierung des Luziferase-Reportersystems

(A) Nach Transfektion von 5 μ g Reporterplasmid pL6G2Luc und 1 μ g pRL-TK sowie von 2 μ g eines der Plasmide pGal4-VP16, pGalNRF1 oder p65Lex wurde die Aktivität der Firefly-Luziferase gemessen. Das Hintergrundsignal wurde aus Zellen, die mit pL6G2Luc und pRL-TK transfiziert wurden, ermittelt. Die Werte sind logarithmisch dargestellt. Die Daten wurden auf den Transfektionsansatz mit dem Plasmid pGalNRF1 normiert und dieser gleich eins gesetzt. (B) Messung der Renilla-Luziferaseaktivität pro Ansatz. Auch hier wurde das Lysat von mit pL6G2Luc und pRL-TK transfizierten Zellen als Hintergrundsignal verwendet. (C) Ermittlung der relativen Firefly-Aktivität (F-Luc/R-Luc) je Ansatz. Die Daten sind logarithmisch aufgetragen und auf den Wert der Transfektion mit pGalNRF1 normiert. Dieser wurde gleich eins gesetzt. Die Ergebnisse wurden aus drei Versuchen gewonnen und der entsprechende Mittelwert dargestellt.

Wie aus der **Abb. 2.28. (C)** hervorgeht, konnte nach Kotransfektion des Vektors pGal4-VP16 ein starker Anstieg der relativen Firefly-Luziferaseaktivität beobachtet werden. Dieses war zu erwarten, da das Protein VP16 generell eine starke Aktivierung der Genexpression bewirkt. Zudem stieg die relative Firefly-Lu-

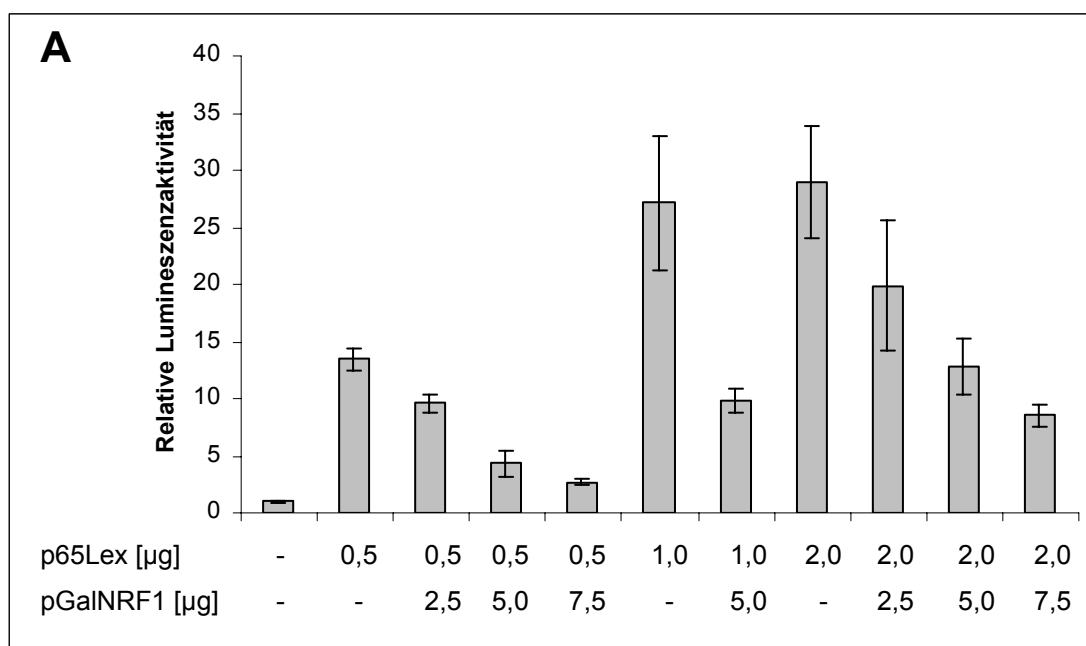
feraseaktivität nach Expression des p65-LexA-Fusionsproteins an. Dieses war ebenfalls zu erwarten, da es sich bei p65 um einen aktivierenden Transkriptionsfaktor handelt (s. 1.5.). Dagegen übte das Gal4-NRF-Fusionsprotein allein einen schwach reprimierenden Einfluss auf die Transkription der Firefly-Luziferase-DNA aus. Auch dieses ist mit dem inhibitorischen Potential von NRF im basalen Zustand zu erklären. Aus den Resultaten kann geschlossen werden, dass das eingesetzte Reportersystem funktionsfähig war und für den Funktionsnachweis der Transkriptionsfaktoren NRF und p65 genutzt werden konnte.

2.7.3. Nachweis der reprimierenden Wirkung von NRF auf die p65 vermittelte Transkription im Luziferase-Reportersystem

Das dargestellte Luziferase-Reportersystem wurde auf Inhibition der p65-Aktivität durch NRF untersucht.

Dabei wurden, aufgrund der letalen Wirkung zu hoher DNA-Mengen, die Konzentrationen von pL6G2Luc und pHRL-TK reduziert (s. **Abb. 2.29**). Zudem wurden in jedem Ansatz verschiedene Mengen der Effektorplasmide p65Lex und Gal4NRF1 kotransfiziert und die Fusionsproteine parallel in HeLa B-Zellen exprimiert.

Die Ergebnisse von drei Messungen sind in **Abb. 2.29** auf dieser und der folgenden Seite dargestellt.



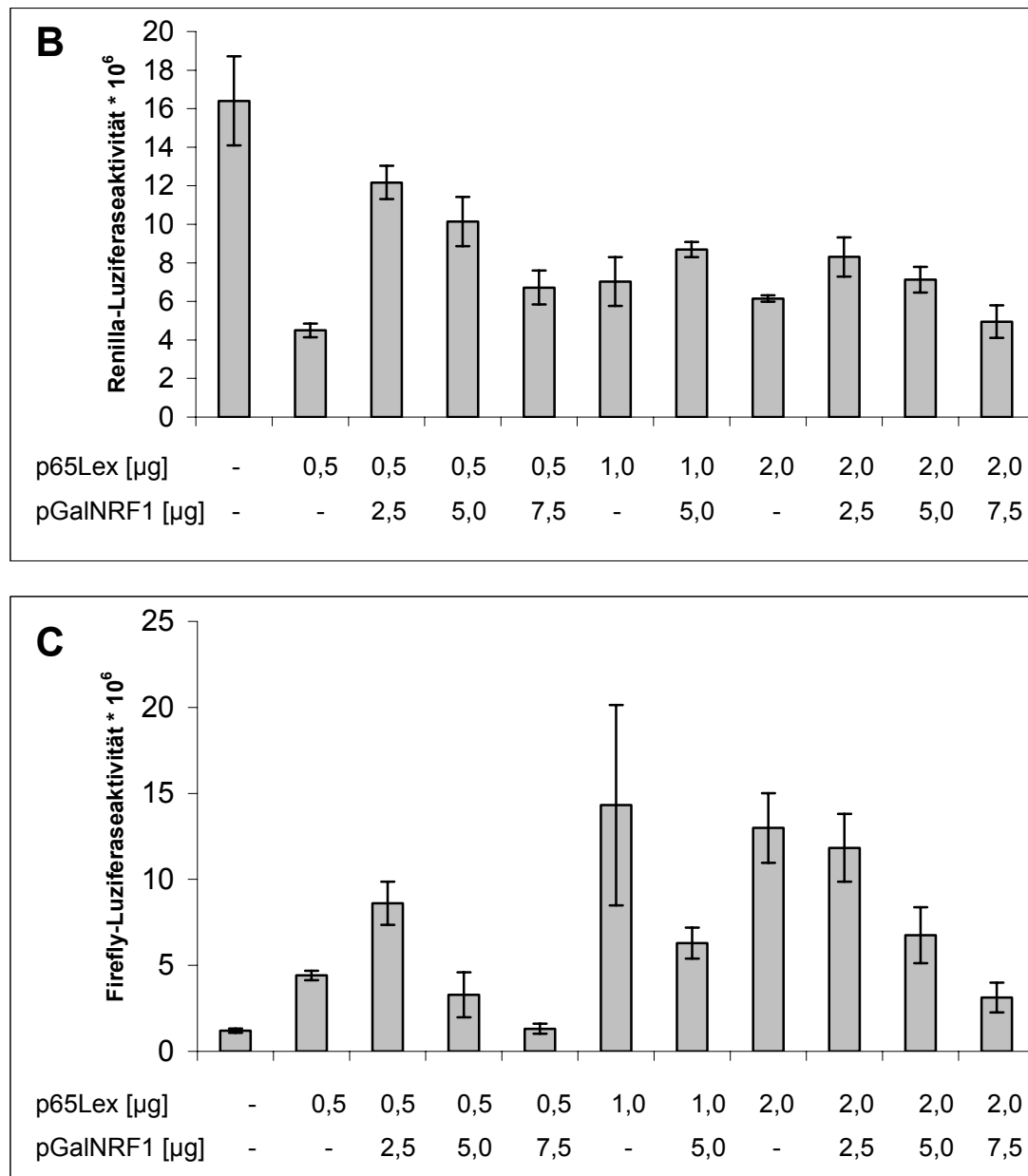


Abb. 2.29. Nachweis des inhibitorischen Effektes von NRF auf die durch p65 aktivierte Transkription anhand des etablierten Luziferase-Reportersystems

(A) Detektion der relativen Firefly-Luziferaseaktivität. HeLa B-Zellen wurden mit je 4 µg Reporterplasmid pL6G2Luc sowie 0,5 µg pRL-TK transfiziert. Die jeweils angegebenen Mengen der Vektoren p65Lex und pGalNRF1 wurden kotransfiziert. Die relative Firefly-Luziferaseaktivität wurde aus je drei Experimenten gemittelt. Zudem wurden die Standardabweichungen berechnet und eingefügt. Für die Messung des Hintergrundes wurden HeLa B-Zellen ausschließlich mit den Plasmiden pL6G2Luc und pRL-TK transfiziert. Dabei wurden die Werte auf die Hintergrundaktivität des Reportersystems normiert. **(B)** Darstellung der Renilla-Luziferaseaktivität der einzelnen Ansätze **(C)** Abbildung der Firefly-Luziferaseaktivität der entsprechenden Ansätze.

In der **Abb. 2.29. (A)** und **(C)** wird gezeigt, dass die Aktivierung der Transkription durch ansteigende Konzentration von p65Lex erhöht wurde. So war eine Verdopplung der relativen Firefly-Luziferaseaktivität durch Zunahme der zugefügten

Menge von p65Lex von 0,5 µg auf 1 µg zu beobachten. Jedoch schien nach Zugabe von 2 µg p65Lex eine Sättigung aufgetreten zu sein, da hier die Aktivierung der Transkription des Reportergens im Vergleich zu 1 µg kaum zunahm. Mit steigender Konzentration des Effektorplasmids pGalNRF1 wurde die Transkription der Firefly-Luziferase zunehmend reduziert. Dabei war die Abnahme proportional zu der eingesetzten Menge an pGalNRF1. Eine maximale Inhibition der Firefly-Luziferaseaktivität auf bis zu 75 % wurde durch den Einsatz von 7,5 µg pGalNRF1 erzielt. Aus diesen Daten ist ersichtlich, dass durch Verwendung des etablierten Luziferase-Reportersystems der inhibitorische Effekt von NRF auf die aktivierende Funktion von p65 nachgewiesen werden konnte.

2.7.4. Untersuchung der reprimierenden Wirkung verschiedener GalNRF-Konstrukte im Luziferase-Reportersystem

Für eine Optimierung des verwendeten Reportersystems und für eine Eingrenzung der für die Repression essentiellen Bereiche auf NRF wurden verschiedene GalNRF-Konstrukte überprüft.

Die eingesetzten Vektoren sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Plasmid	kodiert für NRF-Aminosäuren
pGalNRF	1-690
pGalNRF1	1-380
pGalNRFd1	1-298
pGalNRFd2	1-193
pGalNRFd3	1-94

Tab. 2.3. Auflistung der für die Reporterexperimente verwendeten GalNRF-Konstrukte

Hierfür wurden HeLa B-Zellen mit pL6G2Luc, pHRL-TK, p65Lex und eines der aufgeführten GalNRF-Konstrukte transfiziert (s. **Abb. 2.30.**). Die optimierten Mengen der Effektorplasmide wurden entsprechend der in 2.7.3. dargestellten Untersuchungen gewählt. Nach Lyse der transfizierten Zellen (s. 4.2.1.6. B) wurde die Konzentration der Firefly- und Renilla-Luziferase bestimmt (s. 4.2.2.2.).

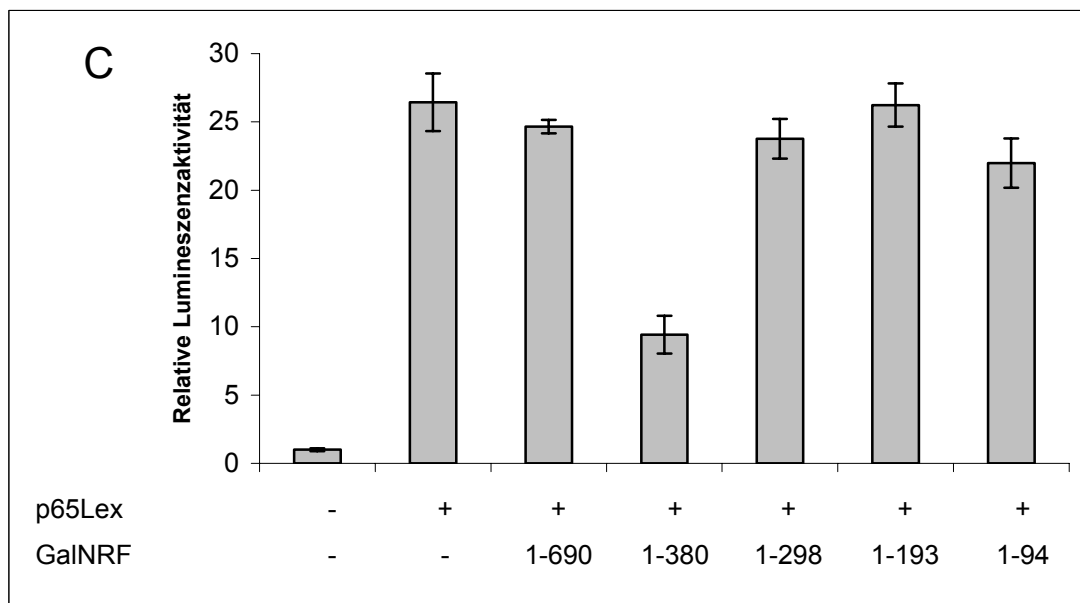
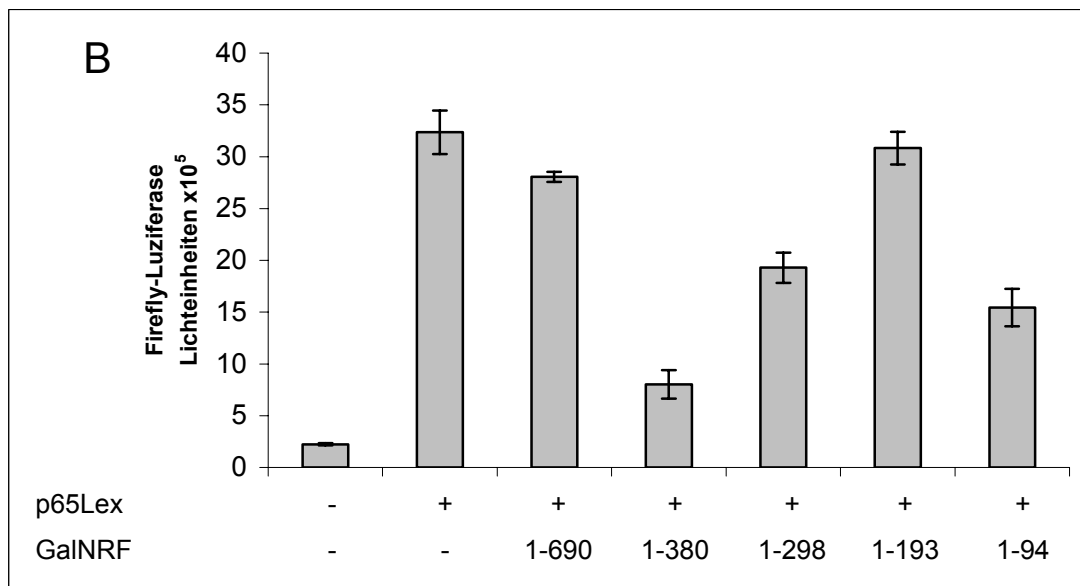
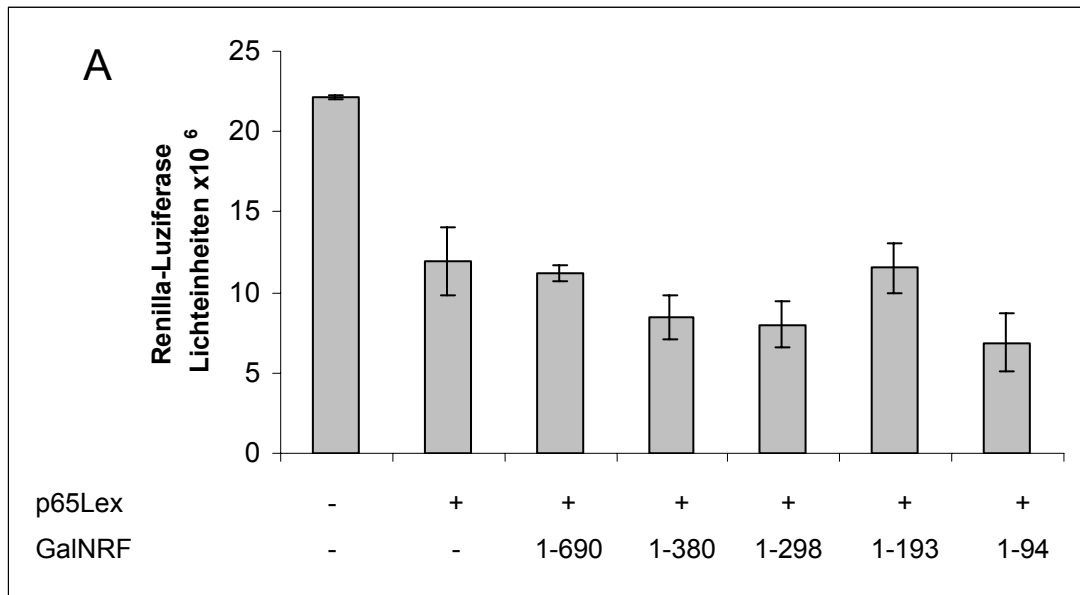


Abb. 2.30. Nachweis der inhibitorischen Wirkung von NRF auf die p65 aktivierte Luziferaseaktivität

(A) Darstellung der Renilla-Luziferaseaktivität der untersuchten Ansätze. HeLa B-Zellen wurden mit 0,5 µg phRL-TK, 4 µg pL6G2Luc und ggf. mit 2 µg p65Lex und 7,5 µg eines der verschiedenen GalNRF-Konstrukte transfiziert. Dabei sind die Aminosäuren von NRF, für die das entsprechende GalNRF-Plasmid kodierte, aufgeführt. Für die Detektion des Hintergrundsignals wurden HeLa B-Zellen mit phRL-TK und pL6G2Luc transfiziert. Die Daten wurden aus dem Mittelwert der Luziferaseaktivitäten von drei Transfektionen bestimmt und mit den jeweiligen Standardabweichungen dargestellt. (B) Abbildung der Firefly-Luziferaseaktivität der jeweiligen Ansätze. (C) Errechnete relative Firefly-Luziferaseaktivität für die Transfektionsansätze. Die ermittelten Werte wurden auf die Hintergrundaktivität des Signals normiert.

Wie aus **Abb. 2.30. (B)** und **(C)** ersichtlich, konnte eine Repression der durch p65 induzierten Transkriptionsaktivität anhand des Konstruktes pGalNRF1 beobachtet werden. Das Plasmid kodierte für die Aminosäuren 1-380 von NRF (s. **Tab. 2.3.**). Dabei war eine Abnahme der Aktivität um mehr als die Hälfte festzustellen. Dagegen führten weitere Deletionen in der NRF-Sequenz (pGalNRFd1, pGalNRFd2, pGalNRFd3) nicht zu einer Inhibition der Transkription der Firefly-Luziferase. Darüber hinaus konnte keine reprimierende Wirkung nach Transfektion des Vektors pGalNRF nachgewiesen werden. Dieses erstaunt, zumal das Plasmid für das vollständige NRF(1-690) kodierte. Möglicherweise könnten zusätzliche DNA- bzw. RNA-bindende Bereiche, die in dem Aminosäurebereich von 381-690 lokalisiert sind, unspezifische Interaktionen von pGalNRF in der Zelle hervorgerufen haben. Zudem könnten sterische Behinderungen die Bindung des Gal4-NRF-Fusionsproteins an die DNA-Bindestelle auf dem Reporterplasmid inhibiert haben.

2.7.5. Nachweis der inhibitorischen Wirkung des vollständigen NRF(1-690) unabhängig von der Gal4-Fusionsdomäne im Reporterexperiment

Die in 2.7.4. ausgeführten Überlegungen sollten nachfolgend überprüft werden. Für eine von der DNA-bindenden Domäne von Gal4 unabhängige Nutzung des Luziferase-Reportersystems wurde ein NRF-bindendes DNA-Element (NRE) in das Reporterplasmid pL6G2Luc eingefügt.

Schematisch ist die Konstruktion des pL6NLuc in **Abb. 2.31.** zusammengefasst. Für die Klonierung wurde der Vektor pL6NCAT, der über eine NRE-Sequenz im Promotorbereich verfügt, mit den Restriktionsenzymen *Pst*I und *Pvu*II geschnitten (s. 4.2.4.5. B). Anschließend wurde das NRE aus pL6NCAT in den mit *Pst*I und *Pvu*II

geöffneten Vektor pL6G2Luc ligiert (s. 4.2.4.6.). Das klonierte Plasmid wurde als pL6NLuc bezeichnet.

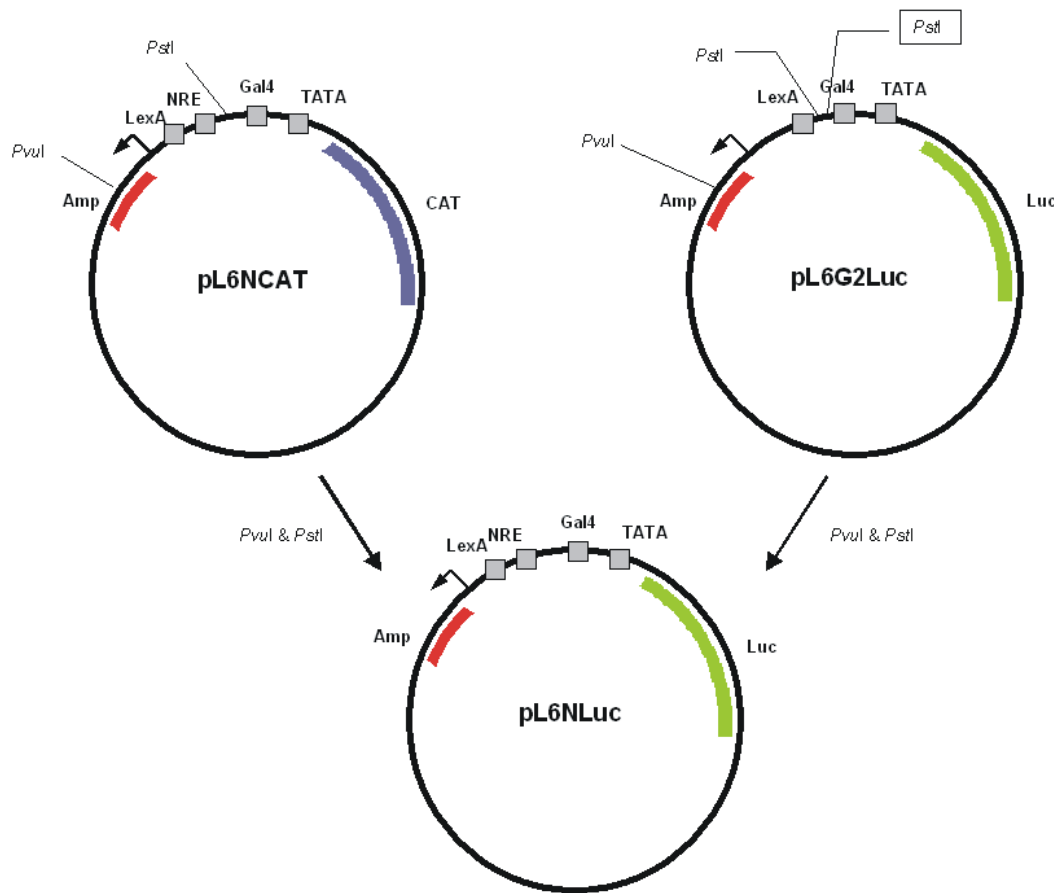


Abb. 2.31. Konstruktion des modifizierten Reporterplasmid pL6NLuc

Für die nachfolgenden Versuche wurde das Reporterplasmid pL6Nluc, der Renilla-standard und p65Lex in HeLa B-Zellen transfiziert (s. **Abb. 2.32.**). Ein für NRF kodierender Vektor wurde kotransfiziert. Hierbei handelte es sich um die Plasmide pNRF1793TAPmut2 und pNRF2722TAPmut2. Beide Vektoren kodierten für das NRF mit der Aminosäuresequenz 1-380 bzw. 1-690 und für das Calmodulin-bindende Peptid des TAPtags. Die Konstrukte besaßen den Vorteil, dass sie ausschließlich einen kleinen Teil der TAP-Domäne aufwiesen. Zudem waren sie bereits vorhanden. Ein erneutes Klonieren von Vektoren, die vornehmlich für NRF allein kodierten, konnte so vermieden werden.

Nach der Lyse der Zellen wurde die Lumineszenzaktivität der Renilla- und Firefly-Luziferase gemessen.

Die Ergebnisse aus **Abb. 2.32. (B)** und **(C)** zeigen, dass das C-terminal verkürzte NRF(1-380) und das vollständige NRF(1-690) in der Lage waren, die transkriptionelle

Aktivität von p65 zu inhibieren. Dagegen zeigte der Vektor, der für die Aminosäuren 1-298 von NRF kodierte, keine inhibitorische Wirkung (s. **Abb. 2.30.**). Somit konnte, basierend auf den Ergebnissen der Reporterexperimente, die inhibitorische Funktion von NRF für den Bereich der Aminosäuren 298-380 detektiert werden.

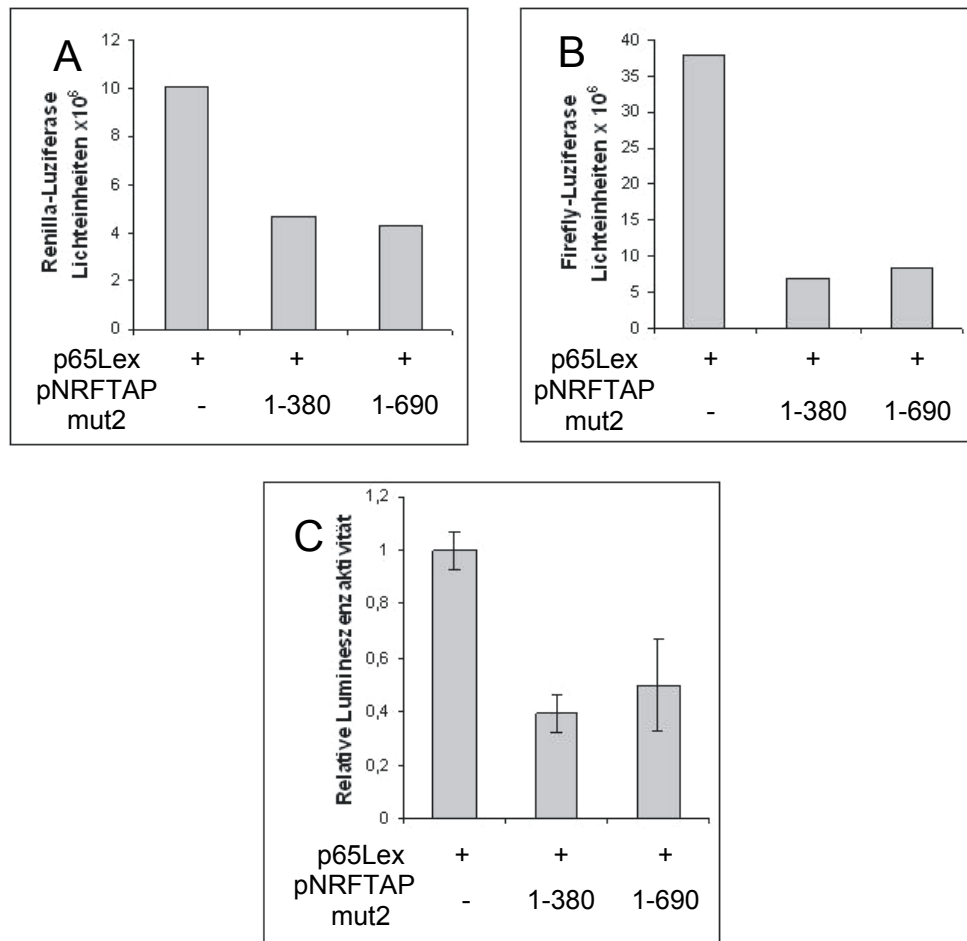


Abb. 2.32. Nachweis des reprimierenden Effektes nach Transfektion von pNRF1793TAPmut2 und pNRF2722TAPmut2 im Reporterexperiment

(A) Abbildung der Renilla-Luziferaseaktivität je Transfektionsansatz. 4 μ g des Reporterplasmids pL6NLuc, 0,5 μ g phRL-TK sowie 2 μ g p65Lex und ggf. 7,5 μ g des Konstruktes pNRF1793TAPmut2 bzw. pNRF2722TAPmut2 wurden in HeLa B-Zellen transfiziert. Nach Lyse der Zellen wurde die Renilla-Luziferaseaktivität ermittelt. (B) Darstellung der gemessenen Firefly-Luziferaseaktivität je Ansatz. (C) Daten für die errechnete relative Firefly-Luziferaseaktivität. Die Messwerte wurden auf die Aktivität der mit p65 stimulierten Probe normiert.

2.8. Modulation der Genexpression durch inhibitorische Peptide

Peptide, die in Protein-Protein-Interaktionen interkalieren, können Funktionen der beeinflussten Proteine stören (Takada *et al.*, 2004).

Vor diesem Hintergrund sollte während dieser Arbeit der Effekt der in 2.5.1. dargestellten Peptide auf die endogene Cytokinexpression untersucht werden. Dabei sollte die partielle Blockade der Interaktion von NRF mit p65 eine Änderung der Genexpression von IL-8 und IFN- β hervorrufen.

Für diese Fragestellung wurde eine Methode etabliert, die einen effizienten Transfer der synthetischen Peptide in den Zellkern ermöglichte. Hierbei handelte es sich um die Nukleofektion, bei der geladene Bestandteile (z.B. DNA) mittels Elektroporation in den Zellkern von Zellen überführt werden.

2.8.1. Kerntransfer von synthetisierten Peptiden mittels Nukleofektion

Da die Methode der Nukleofektion prinzipiell nicht auf den Transfer von Peptiden ausgelegt ist, wurde im Vorfeld der Untersuchungen die Lokalisation von nukleofektierten Peptiden in den verwendeten Zellen überprüft. Gleichzeitig konnte so die Effizienz dieses Kerntransfers detektiert werden.

Für die Beantwortung dieser Fragestellungen wurden HeLa B- sowie HeLa ACC 57-Zellen mit Fluorescein (FITC) gekoppelten Peptid nukleofektiert (s. 4.2.1.5.), das im Folgenden als Peptid F bezeichnet wird.

Die Aminosäuresequenz von Peptid F ist in **Tab. 2.4.** aufgeführt und entspricht, abgesehen von dem Fluorescein, der Sequenz des Peptids B.

Name	Sequenz
F	Fluo-NH- EIP PAD IPK NKK LLT D- COOH

Tab. 2.4. Aminosäuresequenz von Peptid F

Drei bis fünf Stunden nach Nukleofektion wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch betrachtet (s. 4.2.1.5.). Dabei emittiert das Fluorescein des Peptids F Licht in einem Bereich um 530 nm.

Aus **Abb. 2.33. (A)** und **(B)** wird ersichtlich, dass in HeLa B-Zellen von einer höheren Nukleofektionseffizienz des Peptids F ausgegangen werden konnte als in HeLa ACC 57-Zellen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden für die nachfolgenden Versuche HeLa B-Zellen verwendet. Zudem konnte auch eine Anreicherung des Peptids im Zellkern beobachtet werden, wie aus **Abb. 2.33. (C)** hervorgeht. Durch den Nachweis der

Kernlokalisierung von nukleofektierten Peptiden war eine wesentliche Voraussetzung erfüllt, die Methode für die Arbeiten einzusetzen.

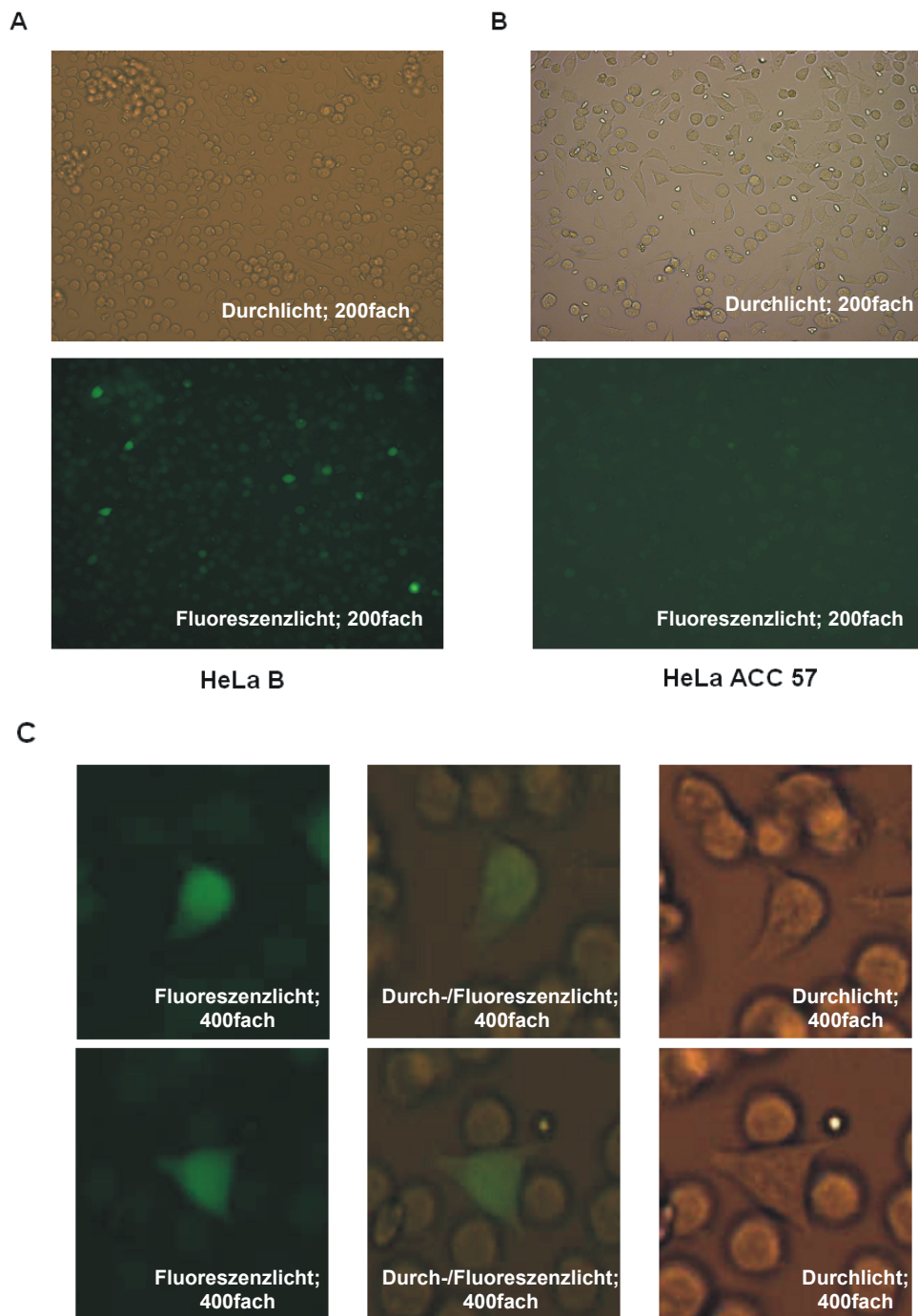


Abb. 2.33. Detektion der Nukleofektionseffizienz und Lokalisation in HeLa B- und HeLa ACC 57- Zellen

(A) Durchlicht- (obere Abbildung) und Fluoreszenzaufnahmen (unteres Bild) fünf Stunden nach Nukleofektion von 20 µg des Peptids F in HeLa B-Zellen. Die Vergrößerung war 200fach. Die Belichtungszeiten wurden von der Software automatisch optimiert. **(B)** Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahmen fünf Stunden nach Nukleofektion von 20 µg des Peptids F in HeLa ACC 57-Zellen bei einer 200fachen Vergrößerung. **(C)** Nachweis der Kernlokalisierung des Peptids F drei Stunden nach Nukleofektion in HeLa B-Zellen. Die Durchlicht- und Fluoreszenzbilder wurden bei einer 400fachen Vergrößerung aufgenommen.

Die fluoreszenzmikroskopische Beobachtung der nukleofektierten HeLa B-Zellen zu verschiedenen Zeiten nach Nukleofektion ergab, dass das Peptid F bis zu fünf Stunden nach dem Kerntransfer in den Zellen stabil vorlag. Zu einem späteren Zeitpunkt wurde eine deutliche Schwächung der detektierbaren Fluoreszenz und somit eine Abnahme der Stabilität des Peptids festgestellt.

Um eine quantitative Aussage über die Nukleofektionseffizienz zu treffen, wurde die halbierte Menge an HeLa B-Zellen erneut mit Peptid F nukleofektiert (**Abb. 2.34.**). Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden drei Stunden nach dem Kerntransfer vorgenommen. Anschließend wurde die Lichtintensität der Zellen mittels Densitometrie grob gemessen (s. 4.2.4.10.).

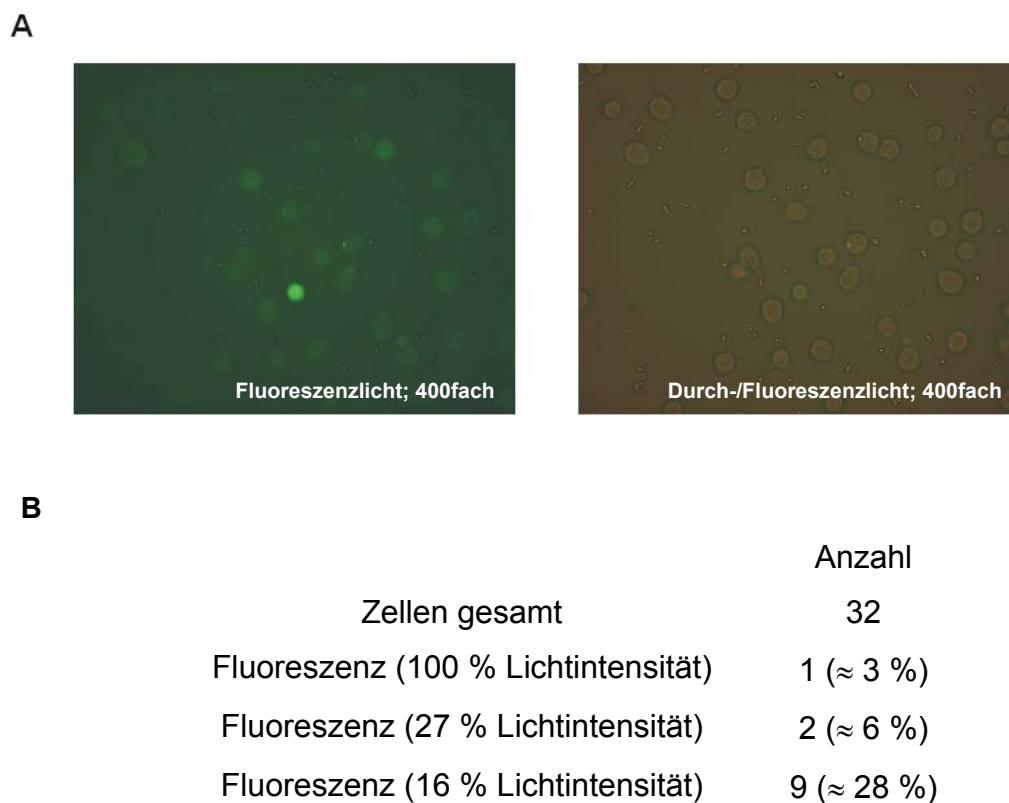


Abb. 2.34. Quantifizierung der Nukleofektionseffizienz in HeLa B-Zellen

(A) Fluoreszenzlicht- (linke Abbildung) und Durch-/Fluoreszenzlichtaufnahmen (rechte Darstellung) der nukleofektierten HeLa B-Zellen drei Stunden nach Nukleofektion von 20 μg des Peptids F. Die Vergrößerung war 400fach. **(B)** Tabellarische Auflistung der Anzahl der im Bildausschnitt dargestellten Zellen sowie die Menge an fluoreszierenden HeLa B-Zellen.

Wie aus der tabellarischen Auflistung in **Abb. 2.34 (B)** ersichtlich wird, konnte ausschließlich für eine Zelle ein starkes Fluoreszenzsignal detektiert werden. Das entsprachen 3 % der Gesamtzahl der im Bildausschnitt dargestellten Zellen (**Abb.**

2.34. (A)). Der mittels Densitometrie gemessene Wert wurde gleich 100 % gesetzt und diente als Richtwert. Demnach konnte für zwei Zellen (6 %) eine vierfach geringere Lichtintensität ermittelt werden, was 27 % des Richtwertes entsprach. Neun Zellen wiesen ein Fluoreszenzsignal von 16 % des Ausgangssignals auf.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass lediglich bei ca. 36 % der untersuchten HeLa B-Zellen eine ausreichende Nukleofektionsrate detektiert werden konnte. Diese relativ geringe Effizienz war unter Berücksichtigung der Tatsache der Optimierung dieser Methode auf den Kerntransfer von DNA, nicht jedoch von Peptiden, leicht verständlich.

Die folgenden Versuche wurden dennoch auf Basis von Nukleofektionen durchgeführt, da grundsätzlich geklärt werden sollte, ob synthetisierte Peptide prinzipiell einen Einfluss auf die NRF vermittelte Genexpression ausübten.

2.8.2. Induktionskinetik der IL-8- und IFN- β -Genexpression

Darüber hinaus wurde untersucht, zu welchem Zeitpunkt nach Stimulation die Genexpression von IL-8 und IFN- β ein Maximum erreichte. Die Annahme war, dass eine Änderung in der Transkriptionsrate durch inhibitorische Peptide bei maximaler Expression deutlicher hervortrat.

Hierfür wurden HeLa B-Zellen mit IL-1 bzw. NDV induziert (s. 4.2.1.4.) und nach zwei, drei, vier, fünf, sechs oder sieben Stunden die RNA isoliert (s. 4.2.4.8.). Nach DNase-Verdau und reverser Transkription (RT) (s. 4.2.4.9.) wurde eine PCR durchgeführt (s. 4.2.4.10.). Hierfür wurden für IL-8 (HIL-8s und HIL-8as; s. 4.1.8.) und IFN- β (HIFNb141 und HIFNb385; s. 4.1.8.) spezifische Primer eingesetzt. Zudem wurde eine Amplifikation mit für Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) spezifischen Primern vorgenommen (s. 4.1.8.). Diese PCR-Produkte dienten als Ladungskontrolle je Ansatz und stellten ein Maß für die Qualität und Quantität der RNA dar.

Die amplifizierten PCR-Fragmente wurden über Agarosegelelektrophorese detektiert. In **Abb. 2.35. (A)** und **(B)** sind die für IL-8 und IFN- β spezifischen PCR-Fragmente zu verschiedenen Zeiten nach Stimulation aufgeführt. Die Daten zeigen, dass ein Maximum der Genexpression von IL-8 drei Stunden nach Stimulation mit IL-1 erreicht

wurde. Die stärkste Expression des IFN- β -Gens war sieben Stunden nach Induktion mit NDV nachweisbar.

Der Versuchsablauf für die folgenden Experimente wurde auf Grundlage dieser Untersuchungen angepasst. So wurden HeLa B-Zellen drei Stunden nach Stimulation mit IL-1 und sieben Stunden nach Induktion mit NDV lysiert und die RNA isoliert.

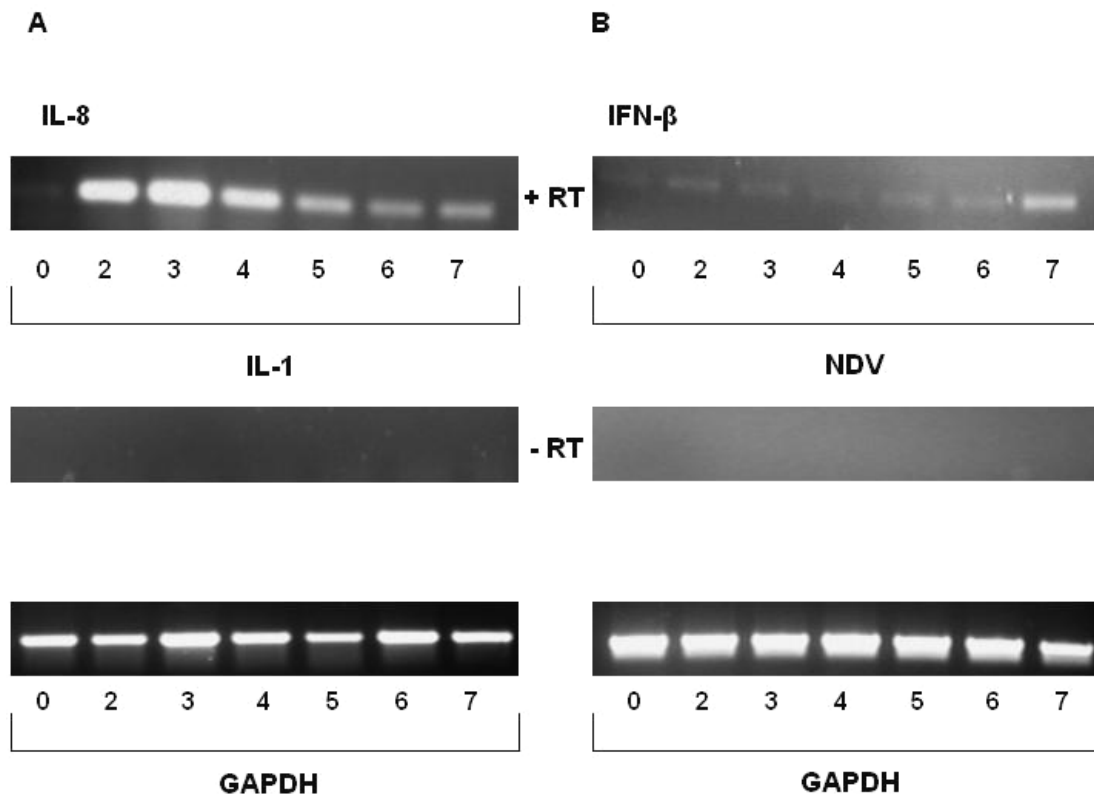


Abb. 2.35. Detektion der zeitabhängigen Stimulation von IL-8 und IFN- β

(A) Darstellung der Genexpression von IL-8 zu verschiedenen Zeiten nach Stimulation mit IL-1. Nach RT mit reverser Transkriptase (+RT) erfolgte die PCR mit den Primern HuiL-8s und HuiL-8as. Als Kontrolle wurde eine RT ohne reverse Transkriptase (-RT) durchgeführt. Für die Bestimmung einer annähernd gleichen Menge und Qualität der RNA je Ansatz wurde eine PCR mit für GAPDH spezifischen Primern gefahren. (B) Detektion der Genexpression von IFN- β zu verschiedenen Zeiten nach Stimulation mit NDV. Die Amplifikation nach RT mit Enzym (+RT) wurde mit den Primern HIFNb141 und HIFNb385 vorgenommen. Auch hier wurde ein Ansatz ohne reverse Transkriptase (-RT) als Kontrolle eingesetzt sowie eine PCR mit für GAPDH spezifischen Primern gefahren.

Auffallend bei diesen Versuchen war die geringe Stimulation des IFN- β -Gens nach Zugabe von NDV. Laut Literaturangaben handelt es sich bei IFN- β jedoch um ein durch virale Stimuli stark induzierbares Gen (Doly *et al.*, 1998).

Das Fehlen eines deutlichen Anstiegs in der Expression könnte auf die verwendeten Zellen zurückgeführt werden. Wie **Abb. 2.36.** zeigt, war in HeLa ACC 57-Zellen acht

Stunden nach Virusstimulation ein deutlicher Anstieg in der Transkription des IFN- β -Gens festzustellen. Dieser Effekt war in HeLa B-Zellen weit weniger ausgeprägt. Der Grund hierfür könnte eine unspezifische Stimulation mit nachfolgender Desensibilisierung der HeLa B-Zellen sein.

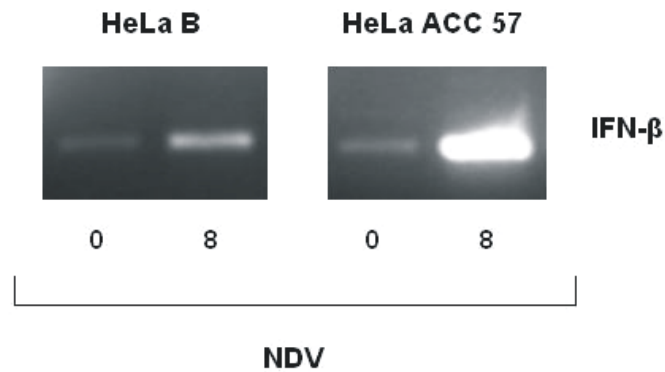


Abb. 2.36. Vergleichende Darstellung der Expression von IFN- β in HeLa B und HeLa ACC 57

HeLa B- sowie HeLa ACC 57-Zellen wurden nicht induziert (0) oder mit NDV stimuliert. Acht Stunden (8) nach der Induktion wurde die RNA isoliert und eine PCR mit für IFN- β spezifischen Primern durchgeführt.

Die nachfolgend dargestellten Ergebnisse gehen ausschließlich auf Daten, die aus zuvor induzierten Zellen gewonnen wurden, ein. Da bereits die Prozedur der Nukleofektion allein in unstimuliert belassenen Zellen eine unspezifische Genaktivierung hervorrief, konnte eine Analyse der Wirkung der Peptide im basalem Zustand nicht vorgenommen werden.

Am Beispiel der IL-8-Genexpression ist dieses in **Abb. 2.37.** zu sehen. Die Ergebnisse zeigen, dass, im Vergleich zu nicht behandelten HeLa B-Zellen, die unspezifische Aktivierung des IL-8-Gens allein durch Gabe von Nukleofektionsreagenz verursacht wurde. Eine zusätzlich vorgenommene Elektroporation der Zellen bewirkte keine nennenswerte Steigerung des Effekts

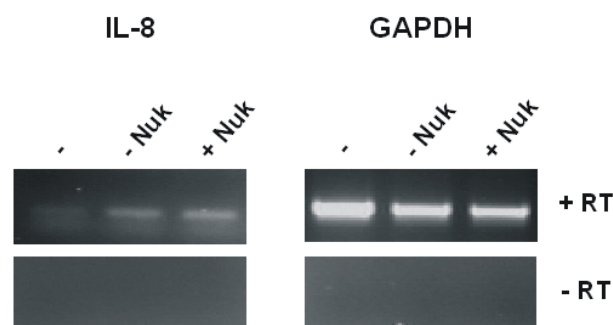


Abb. 2.37. Detektion der unspezifischen IL-8-Genaktivierung in unstimulierten Zellen aufgrund der Durchführung der Nukleofektion

Unstimulierte HeLa B-Zellen wurden nicht nukleofektiert (-), mit Nukleofektionsreagenz behandelt und nicht nukleofektiert (- Nuk) sowie nukleofektiert (+ Nuk). Drei Stunden nach Elektroporation wurde die RNA isoliert, eine RT durchgeführt und IL-8 bzw. GAPDH spezifische PCR-Fragmente amplifiziert. Die im oberen Bildteil dargestellten Gelausschnitte stellen die Daten nach Einsatz der reversen Transkriptase dar (+RT). Als Kontrolle der Kontamination durch genomische DNA wurde eine PCR ohne reverse Transkriptase (-RT) gefahren.

2.8.3. Nachweis der partiellen Inhibition der Genexpression von IL-8 nach Stimulation mit IL-1 durch synthetisierte Peptide

Im Rahmen dieser Arbeiten sollte festgestellt werden, ob die partielle Inhibition der Interaktion von NRF mit p65 durch synthetisierte Peptide einen Effekt auf die Expression des IL-8- bzw. IFN- β -Gens nach Stimulation ausübte.

Hierfür wurden entsprechend der in 2.5.2. beschriebenen Ergebnisse das Peptid X (Kontrolle) und die Peptide B und D verwendet. Zusätzlich wurde das mit Fluorescein gekoppelte Peptid F untersucht. Als Referenz wurden Zellen eingesetzt, die mit Nukleofektionsreagenz behandelt, jedoch nicht nukleofektiert wurden. Als weitere Kontrolle diente ein zusätzliches Peptid, welches eine willkürlich ausgetauschte Sequenz des Peptids B aufwies. Es wird hier als Peptid E bezeichnet.

Die Aminosäuresequenz dieses Peptids ist in der nachfolgenden **Tab. 2.5.** zu sehen.

Name	Sequenz
E	H ₂ N- PEI DPA KIP KNK TDL L- COOH

Tab. 2.5. Aminosäuresequenz des Peptids E

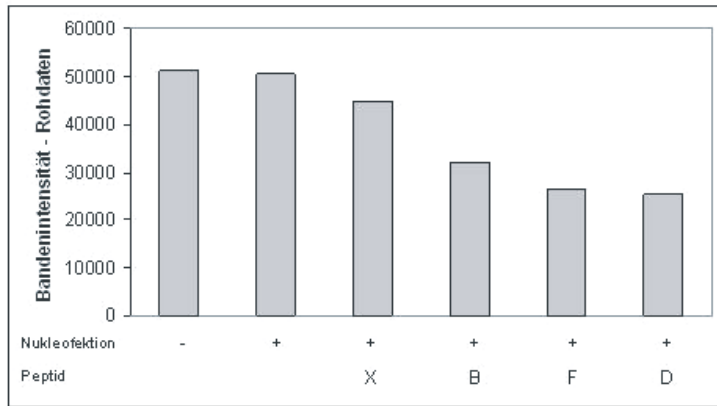
Für die Versuche wurden HeLa B-Zellen mit den beschriebenen Peptiden nukleofektiert (s. 4.2.1.5.) und sofort mit IL-1 stimuliert. Basierend auf den in 2.8.1. und 2.8.2. aufgeführten Vorarbeiten erfolgte die RNA-Isolation und RT-PCR drei Stunden nach Nukleofektion. Nachfolgend wurden die PCR-Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese untersucht (s. 4.2.4.3.) und die Intensität der Banden durch Densitometrie bestimmt (s. 4.2.4.10.).

Die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten sind in **Abb. 2.38. (A) - (C)** wiedergegeben. Da es sich um Einzelwerte handelte, wurden keine Standardabweichungen ermittelt. In **Abb. 2.39.** sind die Ergebnisse dieser drei Untersuchungen

mit den entsprechenden Standardabweichungen für die jeweiligen Versuchsansätze zusammengefasst dargestellt.

A

IL-8



GAPDH

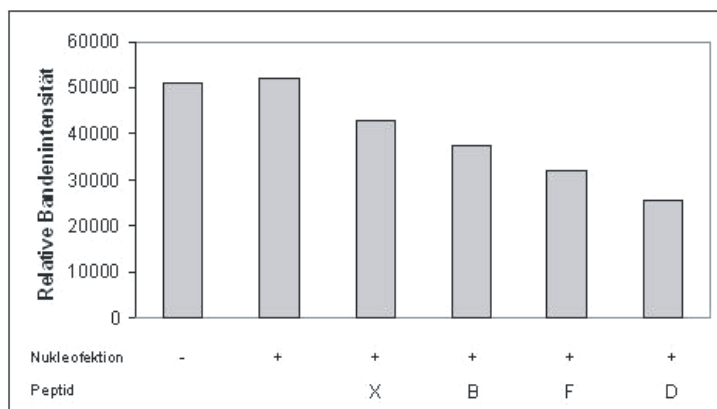
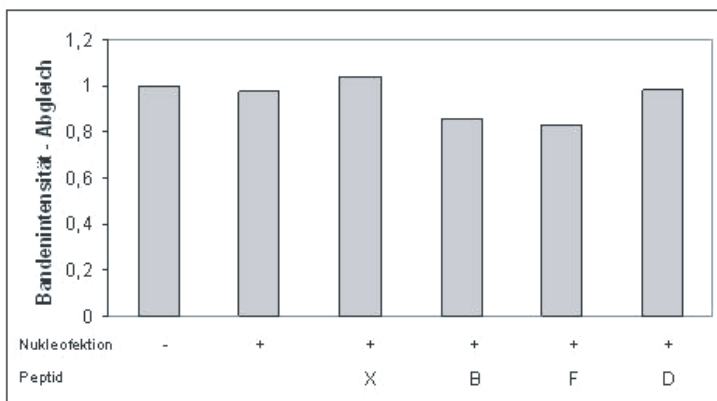
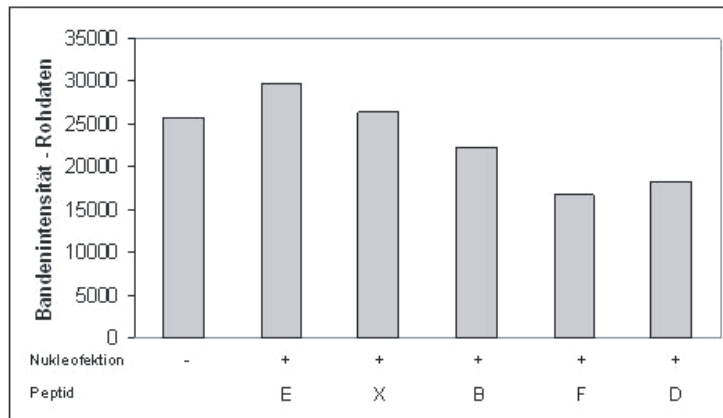
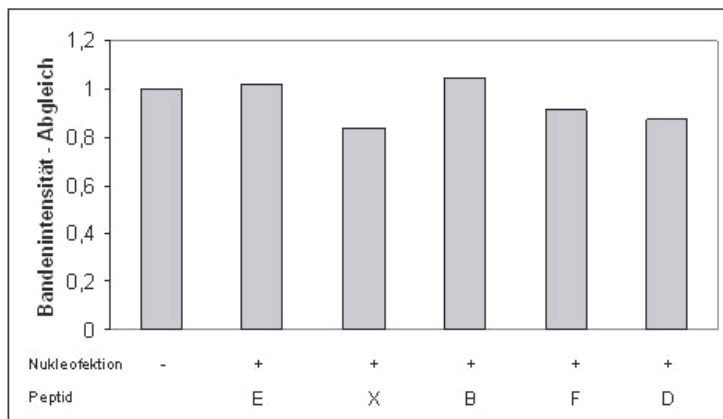


Abb. 2.38. Darstellung der Intensitäten von für GAPDH und IL-8 spezifischen PCR-Fragmenten aus Nukleofektionsansätzen

(A) Bestimmung der Densitometrie von PCR-Fragmenten aus einem unabhängigen Nukleofektionsansatz. In der oberen Abbildung sind die Bandenintensitäten von nicht nukleofektierten HeLa B-Zellen (-) bzw. von nukleofektierten Zellen (+) ohne oder mit je 20 µg der Peptide (X, B, F, D) zu sehen. Rechts von den Diagrammen sind in dem oberen Ausschnitt die analysierten Fragmentbanden dargestellt (+RT). Als Kontrolle wurde eine reverse Transkription ohne Enzym durchgeführt (-RT). In dem mittleren Diagramm sind die Bandenintensitäten von für GAPDH spezifischen PCR-Fragmenten abgebildet. Die Werte wurden abgeglichen, wobei die nicht nukleofektierte Probe als Referenz gleich eins gesetzt wurde. Bestimmt wurden die in dem rechten Ausschnitt sichtbaren Banden. In dem unteren Bild sind die relativen Bandenintensitäten der einzelnen Ansätze zu sehen. Dabei wurden die Rohdaten (erstes Diagramm; IL-8) durch die normierten Werte der GAPDH-Fragmente (zweites Diagramm) dividiert.

B**IL-8****GAPDH**

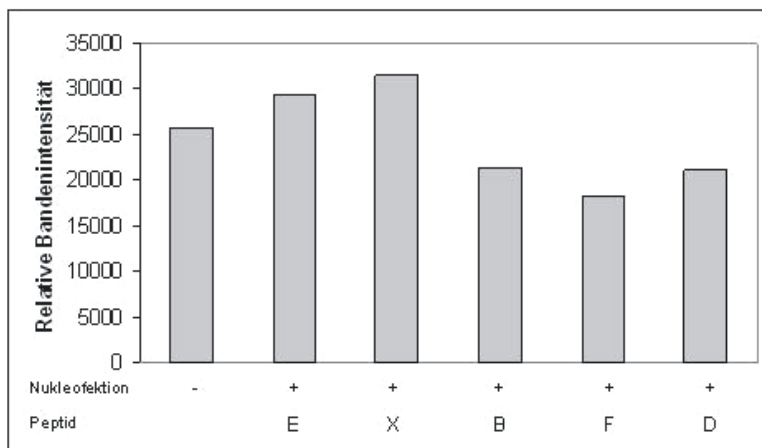
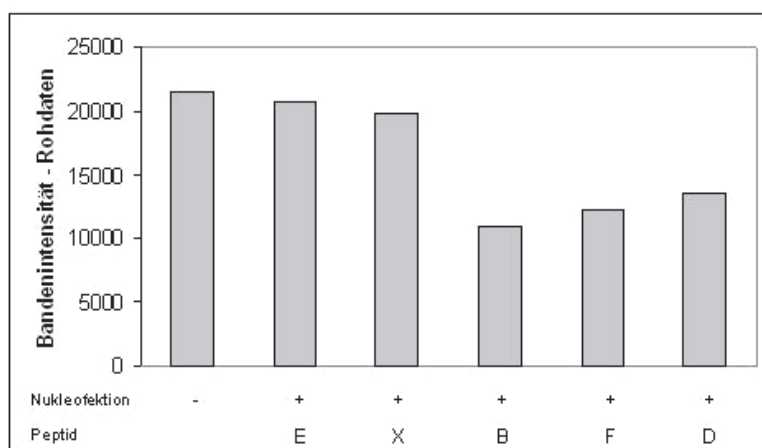


Abb. 2.38. Darstellung der Intensitäten von für GAPDH und IL-8 spezifischen PCR-Fragmenten aus Nukleofektionsansätzen

(B) Bestimmung der Densitometrie von PCR-Fragmenten aus einem unabhängigen Nukleofektionsansatz. HeLa B-Zellen wurden nicht (-) bzw. mit je 20 µg der Peptide E, X, B, F oder D nukleofektiert. Die Bandenintensitäten der Ansätze (Rohdaten) wurden nach PCR anhand für IL-8 (erstes Diagramm) und GAPDH (mittlere Abbildung) spezifischen Primern ermittelt. Die Daten nach Einsatz von GAPDH-spezifischen Primern wurden auf die nicht nukleofektierte Probe normiert. Die entsprechenden PCR-Fragmente (+RT) sowie die Kontrollen ohne Enzym (-RT) sind rechts des jeweiligen Diagramms zu sehen. Die relativen Bandenintensitäten wurden für diese Versuche errechnet (unteres Diagramm). Für die Bestimmung wurden die Intensitäten der IFN- β -Fragmente (Rohdaten) durch die der GAPDH-Banden (Abgleich) dividiert.

C

IL-8



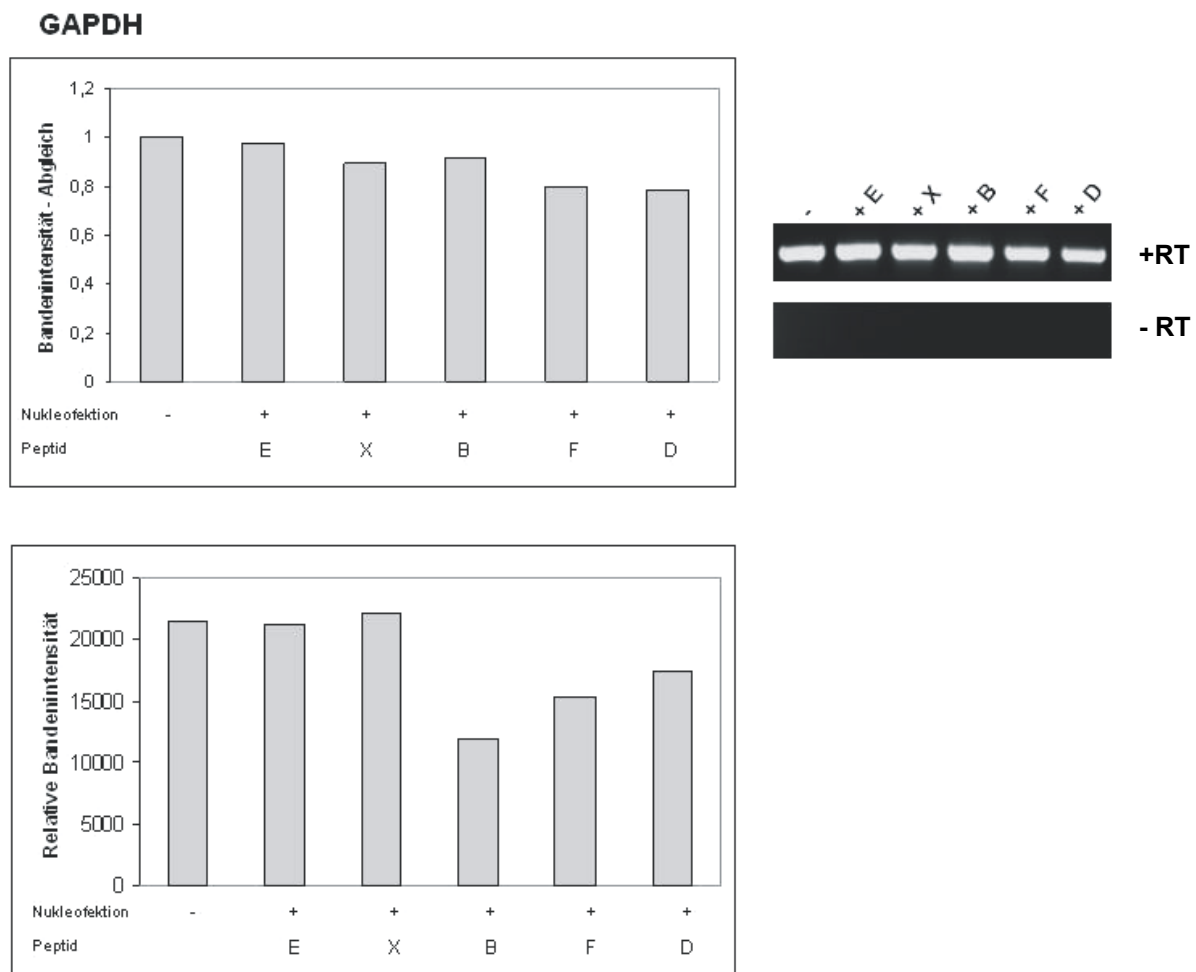


Abb. 2.38. Darstellung der Intensitäten von für GAPDH und IL-8 spezifischen PCR-Fragmenten aus Nukleofektionsansätzen

(C) Bestimmung der Densitometrie von PCR-Fragmenten aus einem unabhängigen Nukleofektionsansatz. Die Zellen wurden nicht (-) bzw. mit je 20 µg der Peptide E, X, B, F und D nukleofektiert. In dem oberen Diagramm sind die Bandenintensitäten der mittels IL-8-Primer erworbenen Fragmente dargestellt. Die mittlere Abbildung zeigt die abgeglichenen Intensitäten der durch GAPDH-spezifischen Primer ermittelten Werte. Die analysierten Gelausschnitte (+RT) sowie die Kontrolle ohne reverse Transkriptase (-RT) sind jeweils rechts der Diagramme zu sehen. In der unteren Abbildung sind die relativen Bandenintensitäten pro Ansatz dargestellt. Für die Bestimmung wurden die Intensitäten der IFN-β-Fragmente (Rohdaten) durch die der GAPDH-Banden (Abgleich) dividiert.

Wie aus **Abb. 2.38. (A) - (C)** hervorgeht, wurde die Genexpression von IL-8 nach Stimulation durch Nukleofektion von Peptiden beeinflusst. So konnte nach Kerntransfer der Peptide B, F und D eine moderate Repression der Transkription im Vergleich zu derjenigen der nicht nukleofektierten Referenzprobe beobachtet werden. Hierbei handelte es sich um Peptide, die einen Abschnitt der minimalen Interaktionsdomäne von NRF wiedergaben (s. 2.5.1.) und die eine partielle Inhibition der Interaktion von NRF mit p65 *in vitro* bewirkten (s. 2.5.2.). Die Kontrollpeptide X und E übten keinen wesentlichen Einfluss auf die Expression des IL-8-Gens aus.

Eine Inhibition der Transkription konnte ausschließlich bei den Peptiden, die eine partielle Repression auf die NRF-p65-Bindung hervorriefen und für die minimale Interaktionsdomäne auf NRF spezifisch waren, festgestellt werden. Es handelte sich hierbei jedoch um eine schwache Repression der Genexpression. In Hinblick auf die geringe Nukleofektionseffizienz der verwendeten Peptide (s. 2.8.1.) ist das Ergebnis leicht erklärbar. Bei einer ausreichenden Elektroporationsrate von 36 % der Zellen kann hier sogar eine nahezu 100 %ige Wirkung der Peptide im Zellkern vermutet werden.

In **Abb. 2.39.** sind die Daten aus den in **Abb. 2.38.** dargestellten Nukleofektionen sowie die jeweiligen Standardabweichungen zusammengefasst wiedergegeben.

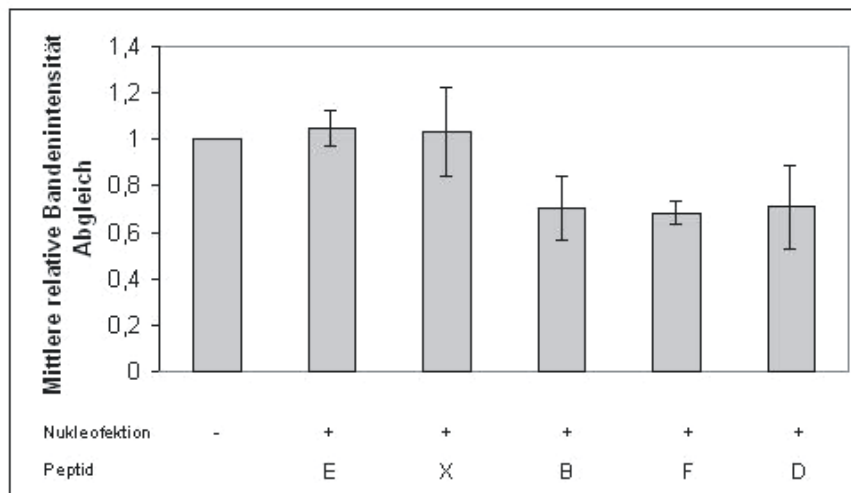
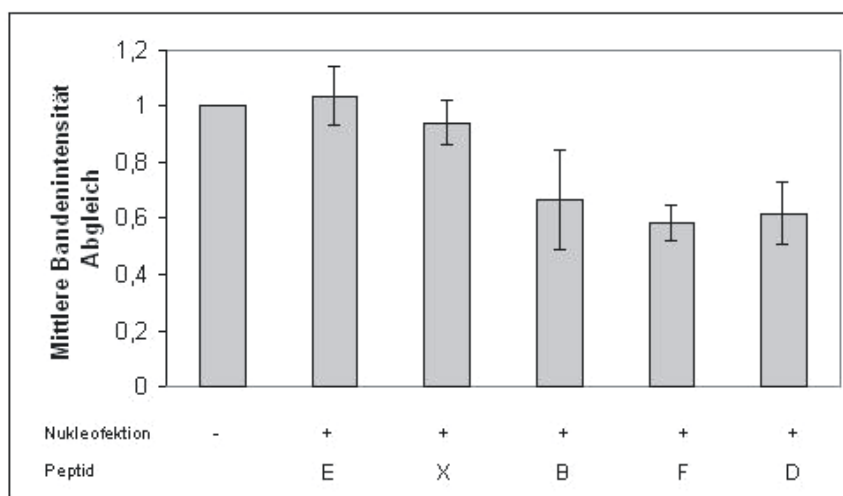
A**B**

Abb. 2.39. Darstellung der Bandenintensitäten aus drei unabhängigen Nukleofektionen

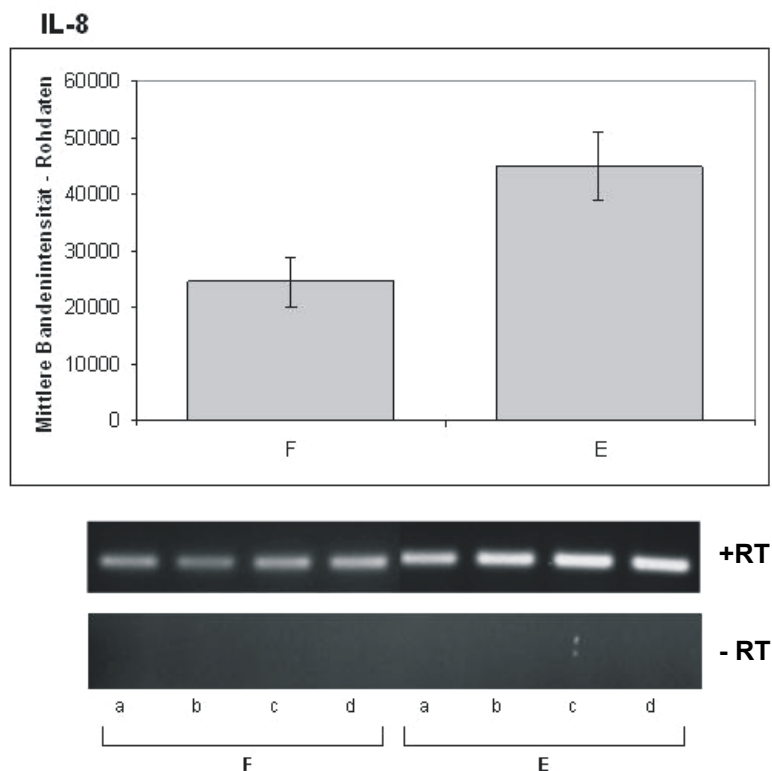
(A) Darstellung der mittleren relativen Bandenintensitäten der drei in **Abb. 2.38.** aufgeführten Versuche. Der nicht nukleofektierte Ansatz wurde jeweils gleich eins gesetzt. Die

Standardabweichungen der Mittelwerte der übrigen Proben sind angegeben. **(B)** Abbildung der mittleren Bandenintensitäten sowie der jeweiligen Standardabweichungen ohne Berücksichtigung der Menge und Güte der RNA (GAPDH). Die Ansätze wurden auf die nicht nukleofektierte Probe normiert.

Die drei unabhängigen Nukleofektionsansätze zeigen, dass nach Kerntransfer der Peptide B, F und D eine um 40 % geringere Genexpression von IL-8 als nach Elektroporation der Peptide E und X festgestellt werden konnte. Zudem sind die Daten der errechneten mittleren relativen Bandenintensitäten (**Abb. 2.39. (A)**) bzw. der mittleren Bandenintensitäten ohne GAPDH-Abgleich (**Abb. 2.39. (B)**) vergleichbar. Aufgrund dieser Übereinstimmung konnten die gewonnenen Ergebnisse verifiziert werden.

Da nach Analyse der Gesamtzahl der verwendeten HeLa B-Zellen schwache Effekte der Peptide beobachtet werden konnten, sollten die beschriebenen Ergebnisse durch weitere Versuche bestätigt werden. Hierfür wurden je vier Ansätze von HeLa B-Zellen mit den Peptiden F und E nukleofektiert und sofort für drei Stunden mit IL-1 stimuliert.

A



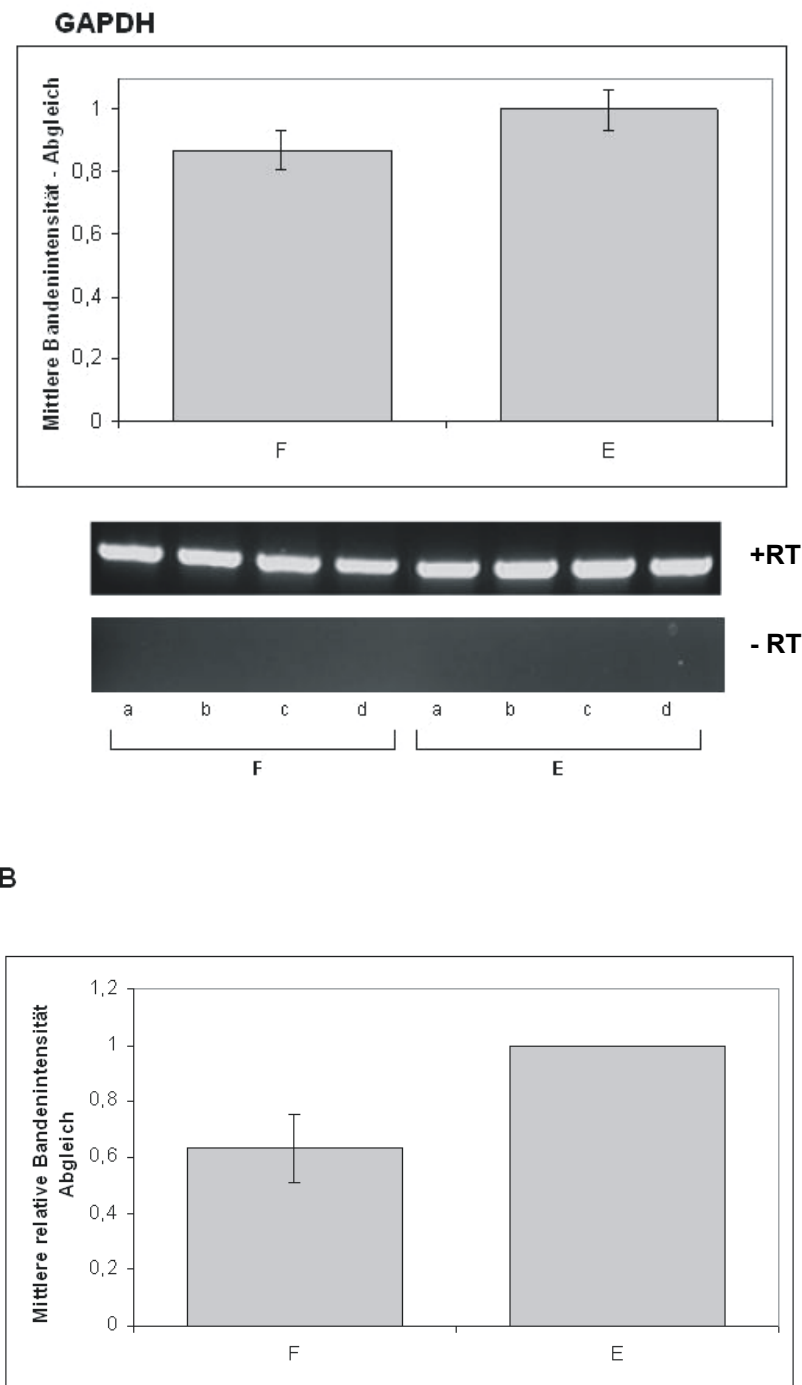


Abb. 2.40. Darstellung der mittleren Bandenintensität aus je vier Nukleofektionen der Peptide F und E

(A) Darstellung der mittleren Bandenintensitäten mit den entsprechenden Standardabweichungen der für IL-8 und GAPDH spezifischen PCR-Fragmente. Es wurden je vier Nukleofektionen mit 20 µg der Peptide F und E durchgeführt. In der oberen Abbildung sind die gemittelten Intensitäten der Rohdaten der für IL-8 spezifischen Produkte zu sehen. Das untere Diagramm zeigt die abgeglichenen mittleren Bandenintensitäten nach Amplifikation der GAPDH-Genabschnitte. Die analysierten Fragmente (+RT) sowie die Kontrolle der RT ohne reverse Transkriptase (-RT) sind in den Gelausschnitten unterhalb der jeweiligen Diagramme aufgeführt. **(B)** Darstellung der mittleren relativen Bandenintensitäten. Für die Bestimmung wurden die Intensitäten der IFN-β-Fragmente (Rohdaten) durch die der GAPDH-Banden (Abgleich) dividiert. Die errechneten Werte für das

Peptid F wurden auf die, die für das Peptid E ermittelt wurden, normiert. Letztere wurden je Ansatz gleich eins gesetzt.

Die in **Abb. 2.40. (A) und (B)** dargestellten Resultate verifizieren Daten aus **Abb. 2.39.** So waren die mittleren Bandenintensitäten der IL-8-Fragmente nach Nukleofektion mit dem Peptid F um ca. 40 % geringer als die nach Kerntransfer des Peptids E. Dementsprechend übte das Peptid F einen inhibitorischen Effekt auf die Expression von IL-8 nach Stimulation aus. Diese Repression ist ebenfalls in den jeweiligen Gelausschnitten unterhalb des ersten Diagramms sichtbar.

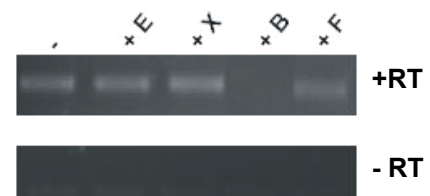
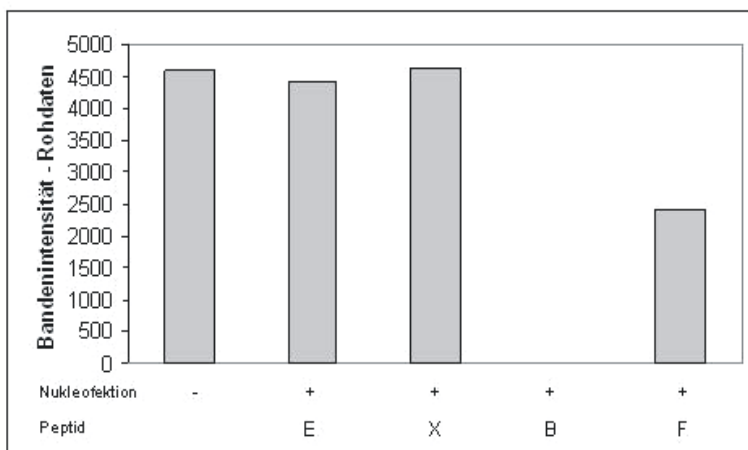
2.8.4. Untersuchung des Einflusses von inhibitorischen Peptiden auf die Genexpression von IFN- β nach Stimulation mit NDV

Der Ablauf der Experimente erfolgte auf Basis der in 2.8.1. aufgeführten Versuche. HeLa B-Zellen wurden mit NDV stimuliert (s. 4.2.1.4.) und drei Stunden bei Standardbedingungen inkubiert. Nach Nukleofektion (s. 4.2.1.5.) der Peptide E, X, B und F und einer weiteren Inkubationszeit wurden die Zellen sieben Stunden nach Stimulation geerntet. Die gewonnenen PCR-Fragmente wurden mittels Agarosegelelektrophorese (s. 4.2.4.3.) analysiert.

Die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Nukleofektionen sind in **Abb. 2.41. (A) und (B)** dargestellt.

A

IFN- β



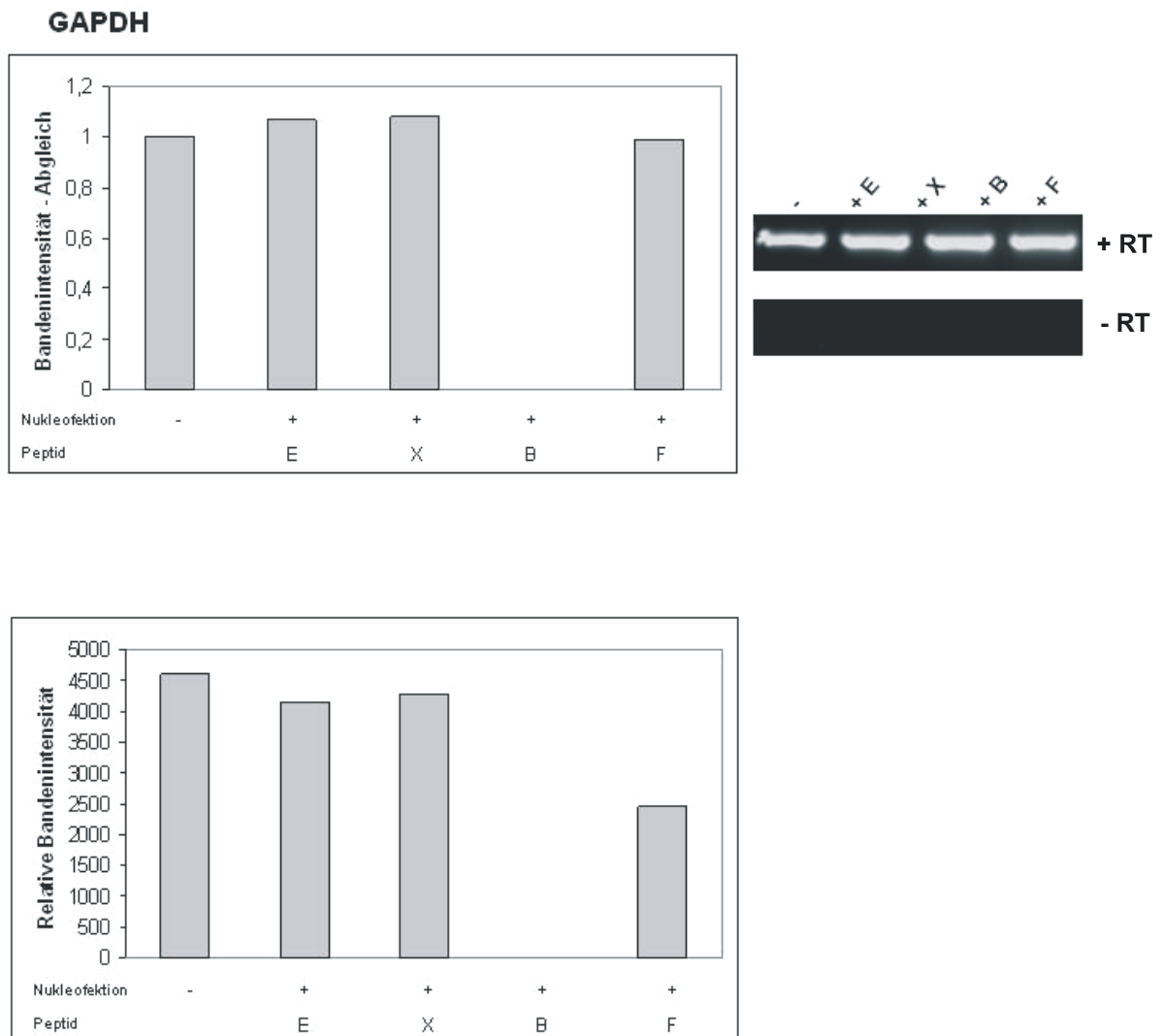


Abb. 2.41. Darstellung der Intensitäten von für GAPDH und IFN- β spezifischen PCR-Fragmenten aus Nukleofektionsansätzen

(A) Darstellung der Bandenintensitäten der IFN- β und GAPDH spezifischen PCR-Banden als Rohdaten bzw. in Form von abgeglichenen Werten. Es wurden Nukleofektionen (+) mit je 20 μ g der Peptide E, X, B und F durchgeführt. Als Kontrolle diente ein nicht nukleofektierter (-) Versuchsansatz. Die abgeglichenen Bandenintensitäten wurden auf die nicht nukleofektierte Probe normiert. Auf der rechten Seite der jeweiligen Diagramme sind die analysierten Gelausschnitte abgebildet. Bei dem unteren Ausschnitt handelt es sich um die Kontrolle ohne reverse Transkriptase (-RT). In dem letzten Diagramm sind die relativen Bandenintensitäten der einzelnen Ansätze zu sehen. Die Intensitäten der IFN- β -Fragmente (Rohdaten) wurden durch die der GAPDH-Banden (Abgleich) dividiert.

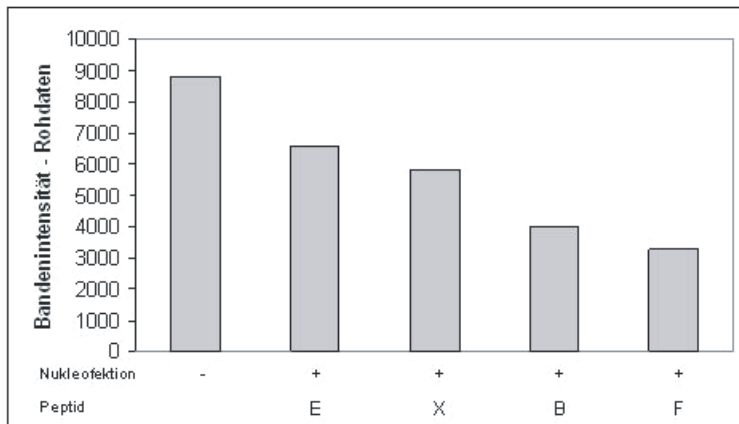
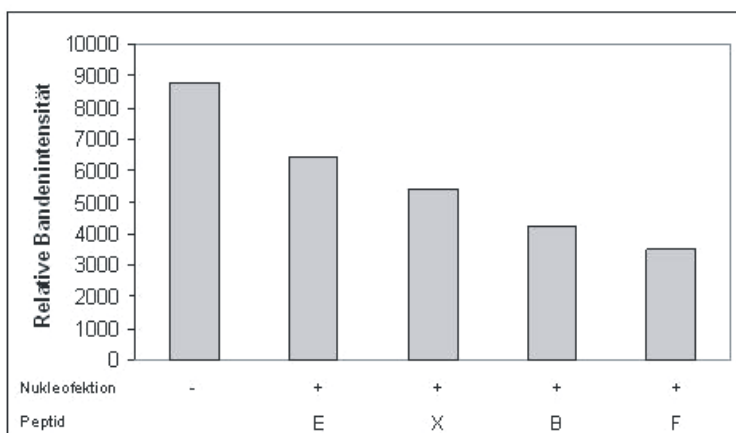
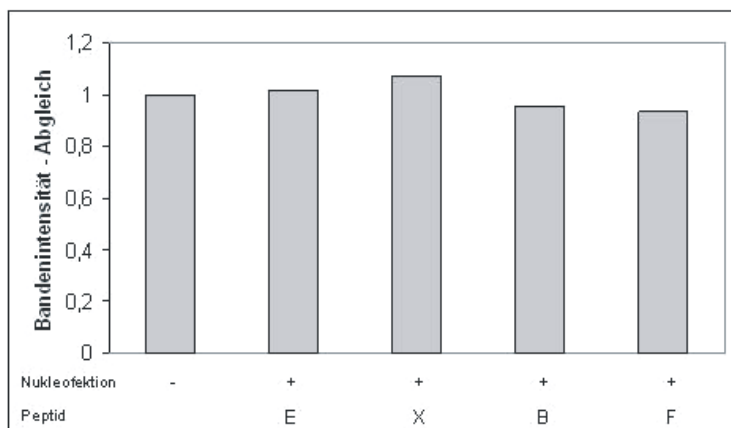
B**IFN- β** **GAPDH**

Abb. 2.41. Darstellung der Intensitäten von für GAPDH und IFN- β spezifischen PCR-Fragmenten aus Nukleofektionsansätzen

(B) Darstellung der Bandenintensitäten (Rohdaten) der IFN- β -Fragmente. Die auf die nicht nukleofektierte Probe (-) abgeglichenen Intensitäten der GAPDH-Banden sind in dem mittleren Diagramm zu sehen. Auf der rechten Seite der beiden Abbildungen sind die Gelausschnitte der Ansätze mit (oberer Ausschnitt; +RT) und ohne (unterer Bildteil; -RT) reverser Transkriptase zu sehen. Die relativen Bandenintensitäten werden in der untersten Abbildung gezeigt. Für die Bestimmung wurden die Intensitäten der IFN- β -Fragmente (Rohdaten) durch die der GAPDH-Banden (Abgleich) dividiert.

Aus **Abb. 2.41. (A)** und **(B)** geht hervor, dass die Expression des IFN- β -Gens nach Nukleofektion mit den Peptiden B und F wenig stärker reprimiert wurde als nach Kerntransfer der Peptide E und X. Hierbei handelte es sich um Peptide, die einen Bereich der minimalen Interaktionsdomäne auf NRF repräsentierten und eine partielle Inhibition der NRF-p65-Interaktion hervorriefen (s. 2.5.2.). Somit könnte auch hier die partielle Repression der Genexpression von IFN- β nach Stimulation auf die Blockade der NRF-p65-Bindung zurückgeführt werden. Allerdings konnte auch nach Nukleofektion der Peptide E und X ein Abfall in der Intensität der analysierten PCR-Fragmente und somit eine schwächere Expression des IFN- β -Gens beobachtet werden (**Abb. 2.41. (B)**). Dieses könnte darauf zurückzuführen sein, dass die IFN- β -Fragmente nach PCR nur schwach amplifiziert wurden. So könnten Ungenauigkeiten in der Bestimmung der Bandenintensitäten aufgetreten sein. Andererseits ist es auf Ebene der Transkriptionsregulation von NRF wahrscheinlich, dass der Einfluss der Peptide auf die induzierte Genexpression von IFN- β deutlich geringer war als auf die stimulierte Transkription von IL-8. So übt NRF keinen nennenswerten Effekt auf die virusinduzierte Expression des IFN- β -Gens aus (Nourbakhsh & Hauser, 1999).

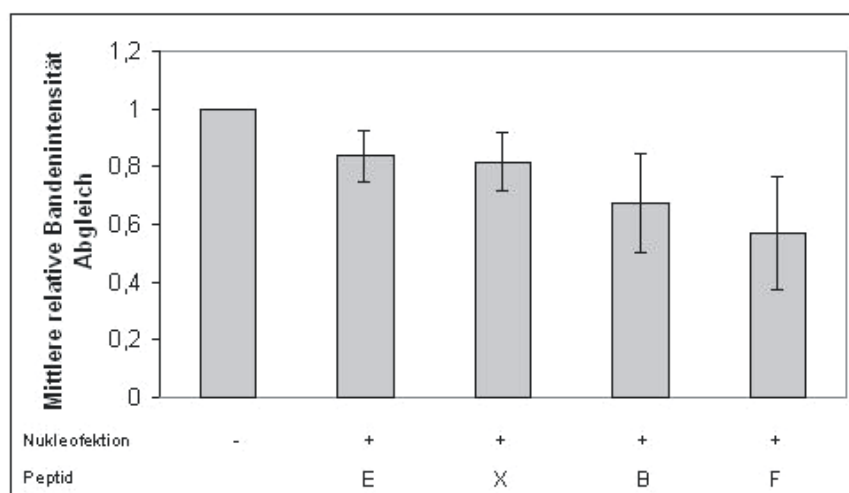


Abb. 2.42. Darstellung der mittleren relativen Bandenintensitäten der IFN- β -Fragmente aus je drei Nukleofektionen

Darstellung der mittleren relativen Bandenintensitäten nach GAPDH-Abgleich aus je drei unabhängigen Nukleofektionen pro Ansatz. Aufgetragen sind die jeweiligen Mittelwerte

sowie die Standardabweichungen. Die Bandenintensitäten wurden auf die Werte aus den nicht nukleofektierten Proben normiert, die entsprechend gleich eins gesetzt wurden.

In **Abb. 2.42.** sind die mittleren relativen Bandenintensitäten von je drei Nukleofektionen pro Ansatz sowie die entsprechenden Standardabweichungen zusammengefasst dargestellt. Die nicht nukleofektierte Probe diente als Referenz und wurde jeweils gleich eins gesetzt.

Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, dass ausschließlich geringe Unterschiede zwischen den einzelnen Nukleofektionen auftraten und dass voraussichtlich der Effekt der NRF spezifischen Peptide auf die induzierte IFN- β -Genexpression gering ist.

3. Diskussion

Das Hauptziel der durchgeführten Arbeit war die Charakterisierung und funktionelle Analyse der Interaktion des NF- κ B reprimierenden Faktors (NRF) mit bindenden Proteinen in Säugerzellen. Dabei wurde der Schwerpunkt auf die Interaktion von NRF mit NF- κ B (p65) (kurz: p65) gelegt.

Diese Fragestellung wurde anhand verschiedener methodischer Strategien untersucht. Hierzu zählten die TAP-Fusionsproteinaufreinigung, Reporterexperimente und Nukleofektionen mit synthetisierten Peptiden.

Entsprechend der Zielsetzung wird die Diskussion in einzelne Abschnitte aufgliedert, in denen jede hier eingesetzte Strategie gesondert behandelt wird. Abschließend wird, basierend auf den erarbeiteten Ergebnissen, eine hypothetische Modellvorstellung der Regulation NRF und NF- κ B abhängiger Gene vorgestellt.

3.1. Charakterisierung der Funktionsdomänen von NRF

3.1.1. Einsatz und Optimierung der TAP-Fusionsproteinaufreinigung

Für die Interaktionsuntersuchungen wurde die Methode der TAP-Fusionsproteinaufreinigung (von: Tandem affinity purification) in humanen HeLa B-Zellen verwendet (s. 2.1.1.).

Ursprünglich wurde diese Methode in Hefen entwickelt (Rigaut *et al.*, 1999) und erfolgreich für die Isolation von Multiproteinkomplexen eingesetzt (Rigaut *et al.*, 1999; Gavin *et al.*, 2002). Eine Übertragung der TAP-Aufreinigung auf Säugerzellen stellt eine Möglichkeit dar, spezifische, transiente, stimulus- und modifikationsabhängige Veränderungen detektieren zu können. Die Etablierung dieser Methode in Zellen höherer Eukaryonten ist jedoch mit Schwierigkeiten verbunden. Dieses wird u.a. durch die Limitierung der eingesetzten Zellzahl, das Auftreten toxischer Effekte durch Überexpression des Fusionsproteins und Konkurrenz der freien Bindungsstellen durch endogene Proteine hervorgerufen. Dennoch konnte gezeigt werden, dass die Methode unter Modifikation der TAP-Domäne auf Säugerzellen übertragbar ist (Knuesel *et al.*, 2003; Drakas *et al.*, 2005).

Die Koimmunopräzipitation von interagierenden Komponenten setzt die Durchführung der TAP-Aufreinigung unter möglichst schonenden Bedingungen voraus. Dieses resultiert jedoch in einem relativ geringen Reinheitsgrad der aufgereinigten Fraktionen. Ein weiteres Problem stellt die geringe Ausbeute der TAP-Aufreinigung dar. Unter Berücksichtigung dieser Aspekte wurden im Rahmen dieser Arbeiten einige Veränderungen des Originalprotokolls vorgenommen. Um aufgereinigte NRF-TAP-Fusionsproteine in höherer Konzentration zu erhalten, wurden anstelle von Gesamtzelllysaten Kern- und Cytosolfractionen gewonnen und beide Fraktionen nachfolgend mit der IgG-Matrix inkubiert (s. 4.2.2.1.). Potentielle, cytosolständige Interaktionspartner konnten in einem weiteren Inkubationsschritt mit dem an die IgG-Antikörper gebundenen und aufkonzentrierten NRF interagieren. Zudem wurden die Proteinkomplexe durch zusätzliche Gabe des Proteinaseinhibitors (E64) zu der TEV-Protease-Spaltung stabilisiert, da diese bei Raumtemperatur durchgeführt wurde.

3.1.2. Charakterisierung und Eingrenzung der p65 bindenden Domäne des NRF auf 104 Aminosäuren

Unter Einsatz dieser abgewandelten TAP-Aufreinigungsmethode wurde eine Interaktion von NRF mit p65 erfolgreich nachgewiesen.

Dabei konnte gezeigt werden, dass die N-terminalen 149 Aminosäuren von NRF nicht mit p65 interagierten (**Abb. 2.4.**). Darüber hinaus übten Phosphorylierungsmutanten, die an drei Positionen in dem N-terminalen Bereich des Proteins vorgenommen wurden (s. 2.1.2.), keinen Einfluss auf die NRF-p65-Interaktion aus (**Abb. 2.5.**).

Aus der Literatur geht hervor, dass NRF auf den Promotor des Interleukin (IL)-8-Gens eine duale Funktion ausübt (Nourbakhsh *et al.*, 2001). Diese nach Induktion detektierte koaktivierende Funktion von NRF (s. 1.6.3.) könnte auf Änderungen der Interaktionseigenschaften zu Faktoren der Transkriptionsmaschinerie zurückgeführt werden. Vor diesem Hintergrund wurde die Bindung von p65 an NRF nach Stimulation mit IL-1 und Newcastle Disease Virus (NDV) untersucht. Die erworbenen Ergebnisse zeigen jedoch keine Veränderungen des NRF-p65-Interaktionsmusters nach Stimulation (**Abb. 2.6.** und **Abb. 2.7.**). So könnten vielmehr Modifikationen des Phosphorylierungsmusters von NRF oder Abwandlung der Bindungseigenschaften

zu noch nicht untersuchten Interaktionspartnern eine Erklärungsmöglichkeit der dualen Funktion liefern.

Basierend auf den beschriebenen Ergebnissen aus **Abb. 2.4.** wurde der Interaktionsbereich von NRF zu p65 auf eine minimale Bindedomäne eingegrenzt. Die erworbenen Daten verdeutlichen, dass die Aminosäuren 204-308 auf NRF für die Interaktion mit p65 ausreichend waren (**Abb. 2.15.**). Diese Resultate werden durch Literaturangaben gestützt, wonach die Aminosäuren an Position 193-296 von NRF als essentiell für die Repression der transkriptionellen Aktivität der NF- κ B-Bindestelle auf dem IFN- β -Promotor angesehen werden kann (Nourbakhsh & Hauser, 1999).

Insbesondere durch die Tatsache des Zusammenbringens der Kern- und Cytosolfractionen im Rahmen der TAP-Aufreinigung konnte eine direkte Bindung von p65 an NRF nicht vorausgesetzt werden. Versuche mit bakteriell exprimierten GST-NRF-Fusionsproteinen zeigten jedoch, dass NRF mit NF- κ B Faktoren über eine direkte Bindung in Interaktion tritt (Nourbakhsh & Hauser, 1999). Somit kann davon ausgegangen werden, dass diese Ergebnisse auf direkte Proteinbindung zurückgeführt werden können.

3.1.3. Detektion der Bindung der Rel-Homologie-Domäne (RHD) von p65 an NRF

Entsprechend der näheren Definition der bindenden Domäne auf NRF wurde anhand der TAP-Aufreinigung der interagierende Bereich auf p65 eingegrenzt.

Alle NF- κ B Faktoren gehören zu der Rel-Proteinfamilie und sind durch eine N-terminal gelegene und ungefähr 300 Aminosäuren umfassende, hochkonservierte Rel-Homologie-Domäne (RHD) charakterisiert (Chen & Greene, 2004). Vor diesem Hintergrund und unter Berücksichtigung von Daten, wonach GST-NRF direkt mit allen NF- κ B Faktoren *in vitro* in Interaktion tritt (Nourbakhsh & Hauser, 1999), wurde die RHD als ausreichend für die Bindung vermutet.

Nach Kotransfektion von für NRF-TAP-Fusionsproteine sowie für die RHD von p65 kodierenden Plasmiden und anschließender TAP-Aufreinigung konnte eine Bindung der Rel-Homologie-Domäne allein an NRF detektiert werden (**Abb. 2.18.**). Darüber hinaus wurde eine Interaktion der RHD von p65 an die minimale Bindedomäne von

NRF festgestellt (**Abb. 2.19.**). Laut dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass der N-terminale Bereich von p65 für die Interaktion mit NRF ausreichend ist.

3.1.4. Interaktion von NRF mit Faktoren der Transkriptionsinitiation

Neben p65 könnten weitere Proteine an Zielpromotoren mit NRF interagieren. Um diese Vermutung zu untersuchen, wurde die TAP-Aufreinigung angewandt.

Hierfür lag es nahe, weitere NF- κ B Faktoren auf Bindung zu überprüfen. Die NF- κ B Proteine liegen als dimere Komplexe innerhalb der Zelle vor, wobei das Heterodimer p65/p50 am häufigsten auftritt (Moynagh, 2005). Somit wurde als Folge des Nachweises der Interaktion von p65 mit NRF die Bindung von p50 an das Protein untersucht. Aus den erzielten Daten geht hervor, dass p50 äußerst schwach an NRF bindet (**Abb. 2.8.**). Unter Voraussetzung einer zufriedenstellenden Qualität des für die Detektion von p50 eingesetzten Antikörpers, kann eine Bindung des p65/p50-Heterodimers an NRF vornehmlich über Interaktion mit p65 postuliert werden.

Nachfolgend wurden Untersuchungen der Assoziation von NRF mit Proteinen, die hauptsächlich an der Initiation der Transkription beteiligt sind, durchgeführt. Als theoretische Basis für diese Experimente konnte z.B. die bereits gut beschriebene Aktivierung des IFN- β -Gens nach Virusstimulation herangezogen werden (Thanos & Maniatis, 1995a; Munshi *et al.*, 2001). Darüber hinaus bindet NRF über das NRF-bindende DNA-Element (NRE) an den Promotor von IFN- β (Nourbakhsh & Hauser, 1999), was eine Interaktion des Proteins mit weiteren Komponenten der Transkriptionsmaschinerie wahrscheinlich macht.

Für diese Versuche wurde beispielhaft die Bindung der Komponenten c-Jun, TFIID, dem CREB-Bindeprotein (CBP), c-Fos, mSin3A sowie der Histon-Deacetylase1 (HDAC1) an NRF überprüft. Es handelt sich bei c-Jun, c-Fos sowie TFIID um positive Regulatoren der Transkriptionsinitiation (Lu *et al.*, 2005; Levine & Tjian, 2003). Die Proteine mSin3A und HDAC1 sind in die Inhibition der Transkription involviert (Tong *et al.*, 2005; Lewis *et al.*, 1992). Der Kofaktor CBP stellt einen aktivierenden Faktor dar, der nach Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor CREB die Transkriptionsinitiation über Bindungsvermittlung mit dem generellen Transkriptionsfaktor TFIIB

unterstützt (Kwok *et al.*, 1994; Chrivia *et al.*, 1993). Munshi *et al.* (1998) wiesen CBP jedoch auch eine destabilisierende Funktion in der Transkriptionsinitiation über Acetylierung des Architekturproteins HMGI(Y) (für: High mobility group protein I(Y)) zu.

Die Ergebnisse nach TAP-Aufreinigung der NRF-TAP-Fusionsproteine verdeutlichten, dass weder die positiven Regulatoren der Transkriptionsinitiation wie c-Jun und TFIID noch die Repressoren wie mSin3A und HDAC1 mit NRF interagierten (**Abb. 2.10. und 2.11.**). Die Komponente c-Fos lag unspezifisch sowohl an die NRF-TAP-Fusionsproteine als auch an die TAP-Domäne gebunden vor (**Abb. 2.10. (B)**). Aus diesen Daten könnte geschlossen werden, dass NRF vornehmlich über Interaktion mit p65 an der Regulation der Transkriptionsinitiation beteiligt ist. Dieses wird durch Daten gestützt, wonach NRF die basale Transkription des Humanen Immundefizienzvirus Typ I (HIV-1) nicht auf Ebene der Initiation, sondern auf der der Elongation inhibiert (Dreikhausen *et al.*, 2005). Zudem geht aus mehreren Literaturangaben hervor, dass auch der mit NRF interagierende Faktor NF- κ B in die Transkriptionselongation von IL-8 über die Kinase P-TEFb (Luecke & Yamamoto, 2005), in die von HIV über den generellen Transkriptionsfaktor TFIID (Kim *et al.*, 2006) sowie in die des A20-Gens über den Elongationsfaktor DSIF (Ainbinder *et al.*, 2004) eingreift. Unter Berücksichtigung dieser Angaben und der hier vorgestellten Ergebnisse könnte der Einfluss von NRF auf weitere Faktoren der Transkriptionsinitiation ausgeschlossen werden. In diesem Zusammenhang sollte jedoch bedacht werden, dass bei der eingesetzten Methode der TAP-Fusionsproteinaufreinigung aus Säugerzellen die Ausbeute des NRF-TAP-Fusionsproteins generell relativ gering ist. Somit könnten während der durchgeführten Arbeiten schwach bindende Bestandteile, die nur in geringer Konzentration mit NRF interagierten, nicht mehr nachweisbar gewesen sein. Dabei spielt auch die Qualität des verwendeten Antikörpers eine Rolle, da die Detektion eines Proteins ebenfalls hiervon abhängig ist.

3.1.5. Interaktion von NRF an die Untereinheit E des negativen Elongationsfaktors (NELF)

Basierend auf den in 3.1.4. vorgestellten Überlegungen wurde neben der Untersuchung der Interaktion von NRF mit Faktoren, die vornehmlich an der Transkriptionsinitiation beteiligt sind, Komponenten der Transkriptionselongation auf Bindung getestet.

Gestützt wurden diese Arbeiten durch Daten aus der Literatur, wonach NRF in unstimulierten Zellen die Transkriptionselongation entlang des LTR (für: Long terminal repeat) von HIV-1 inhibierte (Dreikhausen *et al.*, 2005). Dieses ging mit einer Verhinderung der Rekrutierung des Elongationsfaktors DRB sensitivitäts-induzierenden Faktor (DSIF) einher.

Aufgrund dieser Erkenntnisse lag es nahe, DSIF auf Interaktion mit NRF zu untersuchen. Die während der Arbeit erhaltenen Ergebnisse zeigen jedoch, dass Spt5 aus *Saccharomyces cerevisiae*, welches homolog zu der großen Untereinheit p160 von DSIF ist, nicht mit NRF interagiert (**Abb. 2.13.**).

Neben DSIF wurde ein weiterer Elongationsfaktor beschrieben, der die Transkriptionselongation negativ reguliert. Es handelt sich um den negativen Elongationsfaktor (NELF) (Yamaguchi *et al.*, 1999). Die Aktivität des humanen NELF ist mit fünf Polypeptiden A-E assoziiert. Vor dem Hintergrund der bei Dreikhausen *et al.* (2005) beschriebenen Daten sowie unter Berücksichtigung der Tatsache, dass NELF eine negative Regulation ausübt, wurde die Bindung der Untereinheit NELF-E an NRF analysiert.

Die Resultate nach zweifacher Aufreinigung der NRF-TAP-Fusionsproteine wiesen eine eindeutige und spezifische Interaktion von NRF mit NELF-E nach (**Abb. 2.12. (B)**). Dabei wurde die Bindung nicht durch Stimulation mit IL-1 oder NDV beeinflusst. In den verwendeten Western Blots trat eine zusätzliche Proteinbande bei etwa 90 Kilodalton auf (**Abb. 2.12. (C)**). Ihre Größe entsprach annähernd der doppelten Proteinmasse von NELF-E, welches eine Masse von 46 kDa aufweist (Narita *et al.*, 2003). Somit könnte es sich bei dieser schwereren Proteinbande um ein Homo- bzw. Heterodimer von NELF-E handeln. Diese Hypothese ist jedoch fraglich, da bei der verwendeten SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (s. 4.2.2.3.) aufgrund denaturierender und reduzierender Prozesse keine dimeren Komplexe auftreten sollten. Andererseits wurde für den Nachweis von NELF-E ein monoklonaler Antikörper

eingesetzt, der sehr spezifisch das zu detektierende Polypeptid erkennt. Diese Tatsache wiederum würde auf ein Dimer von NELF hindeuten.

In Bezug auf diese Resultate kann die Vermutung aufgestellt werden, dass NRF durch Interaktion mit NELF-E regulierend in die Transkriptionselongation in Säugerzellen eingreift. So könnte NRF eine zusätzliche Stabilisierung des für das kurzzeitige Pausieren der Elongation reprimierenden Komplexes aus RNA-Polymerase II (Pol II), DSIF und NELF bewirken (Sims *et al.*, 2004). So könnte eine korrekte Anlagerung der „Cap“-Struktur am 5'-Ende der neu synthetisierten RNA zusätzlich über NRF vermittelt werden. Hierbei scheint vor allem die Stabilisierung von NELF-E entscheidend zu sein. So kann nach Deletion dieser Untereinheit der gesamte Komplex der einzelnen NELF Faktoren nicht mehr mit DSIF sowie der RNA-Polymerase II interagieren (Yamaguchi *et al.*, 2002). Vor diesem Hintergrund könnte eine spezifische Stabilisierung der Untereinheit NELF-E durch Interaktion mit NRF angenommen werden. Aus Untersuchungen der Transkriptionsregulation von HIV geht hervor, dass das Vorhandensein von NELF in Elongationskomplexen nicht zwangsweise mit einer Repression einhergehen muss (Ping & Rana, 2001). Es wird angenommen, dass der inhibitorische Effekt von NELF mit den RNA-bindenden Eigenschaften verknüpft ist. So konnten Fujinaga *et al.* (2004) am Beispiel des HIV LTR ein Modell aufstellen, wonach der positive Transkriptionelongationsfaktor b (P-TEFb) zusammen mit dem viralen Protein Transaktivator der Transkription (Tat) nicht nur DSIF, sondern auch NELF-E phosphoryliert. Es wird vermutet, dass aufgrund der Phosphorylierung die RNA-bindenden Eigenschaften von NELF verändert werden und der negative Effekt des Faktors aufgehoben wird. Vor diesem Hintergrund könnte NRF, über eine simultane und zusätzlich stabilisierende Bindung an die RNA sowie an NELF-E, die negative Regulation über diesen Faktor potenzieren. Nach Induktion könnte eine kurzfristige und bereits in unserer Arbeitsgruppe von S. Rother detektierte Dephosphorylierung in NRF (persönliche Mitteilung von S. Rother) sowie eine mögliche Phosphorylierung von NELF die Bindung des Komplexes an die RNA abschwächen. Die reprimierende Wirkung von NRF kann in eine koaktivierende umgewandelt werden. In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass bei Niedick *et al.* (2004) mittels computergestützter Analysen in dem C-terminalen Bereich von NRF DNA- und RNA-bindende Domänen identifiziert wurden. Dieses wird durch zusätzliche, während dieser Arbeit durchgeführte Datenbankanalysen gestützt (Falquet *et al.*, 2002). Hiernach besitzt NRF in seinem C-terminalen Bereich eine G-

patch-Domäne (Aravind, 1999) sowie ein R3H-Motiv (Grishin, 1998). Über diese beiden charakteristischen Bereiche könnte NRF mit einzelsträngigen Nukleinsäuren in Kontakt treten. Hierbei kann davon ausgegangen werden, dass die Interaktionsdomäne von NRF mit NELF-E von einem möglichen RNA-Bindebereich verschieden ist. Das wird durch die während dieser Arbeit gewonnenen Daten unterstrichen. So ist die identifizierte und 104 Aminosäuren umfassende minimale Interaktionsdomäne auf NRF für eine Bindung an NELF-E ausreichend (**Abb. 2.16.**). Die Nukleinsäurebindenden Bereiche auf NRF befinden sich jedoch in einem Bereich, der C-terminal von der minimalen Bindedomäne lokalisiert ist.

3.1.6. Nachweis der DNA-Bindung von NRF über die Aminosäuren 381-690

Um die DNA-bindenden Eigenschaften unterschiedlicher NRF-TAP-Fusionsproteine in Säugerzellen zu untersuchen, wurden Chromatin-Immunopräzipitationen (ChIPs) (s. 4.2.1.7.) durchgeführt. Anhand dieser Methode konnten, durch Fixierung von NRF mit Chromatin im Zellkern von verwendeten HeLaB-Zellen, die DNA-bindenden Eigenschaften des Proteins *in vivo* analysiert werden.

Aus den durchgeführten Versuchen geht hervor, dass ausschließlich das NRF mit der vollständigen Aminosäuresequenz 1-690 mit den Promotoren von IL-8 und IFN- β interagiert (**Abb. 2.23.**). Es liegt die Vermutung nahe, dass der C-terminale Bereich auf NRF, der die Aminosäuren 381-690 umschließt, für die Bindung an die DNA essentiell ist. Diese Resultate stimmen mit den in 3.1.5. erwähnten Datenbankanalysen überein, wonach die R3H-Domäne auf NRF, die neben RNA auch einzel- und doppelsträngige DNA bindet, ausschließlich C-terminal identifiziert werden konnte. Durch die Datenbankanalysen wurde eine R3H-Domäne in einem Aminosäurebereich von 600-664 auf NRF entdeckt. Darüber hinaus werden die Daten durch die Tatsache, dass dieses Ergebnis nicht nur für den Promotor eines Gens nachgewiesen werden konnte, validiert.

Interessanterweise weisen die Resultate darauf hin, dass die DNA-Bindung von NRF an den Promotor von IFN- β nach Virusstimulation verstärkt wurde (**Abb. 2.24.**). Dabei wurde dieser Effekt nicht nach Induktion mit IL-1 hervorgerufen. Da die Assoziation an das Chromatin des IFN- β -Gens in IL-1 induzierten Zellen nicht maßgeblich

aktiviert werden konnte, handelt es sich hier voraussichtlich um ein für die Stimulation mit NDV spezifisches Ergebnis.

Die Daten stehen jedoch im Widerspruch zu Literaturangaben, wonach sich die DNA-bindenden Eigenschaften des endogenen NRF nach Virusinduktion nicht veränderten (Nourbakhsh *et al.*, 1993; Nourbakhsh & Hauser, 1999). Im Gegensatz zu den Chromatin-Immunopräzipitationen wurden bei Nourbakhsh *et al.* (1993) diese Untersuchungen an isolierten NRE *in vitro* durchgeführt. Bei den Daten von Nourbakhsh & Hauser (1999) handelte es sich um Reporterexperimente, bei denen indirekt über die Transkriptionsaktivität auf die DNA-Bindung geschlossen werden konnte. Zudem wurde hier nicht das vollständige Protein, sondern ein C-terminal verkürztes NRF (Aminosäure 1-388) sowie eine identifizierte DNA-bindende Domäne (DBD; Aminosäuren 296-388) untersucht.

3.1.7. Nachweis der transkriptionellen Aktivität von NRF

Bereits 1999 beschrieben Nourbakhsh & Hauser einen inhibitorischen Effekt von NRF auf die Bindestelle von NF- κ B im IFN- β -Promotor.

Für die weitere Charakterisierung der reprimierenden Funktion von NRF auf die Transkription kam in der vorliegenden Arbeit ein Reportersystem zum Einsatz. Hier befand sich die als Maß für die Transkriptionsaktivität dienende Firefly-Luziferase-DNA unter der Kontrolle eines Promotors mit Bindestellen für p65-LexA- und Gal4-NRF-Fusionsproteinen (s. 2.7.). Anhand dieses Reportersystems konnte die Aktivität der Luziferase schnell und leicht bestimmt und quantifiziert werden.

Erwartungsgemäß war die transkriptionelle Aktivierung nach Expression des p65-LexA-Fusionsproteins angestiegen (**Abb. 2.28.** und **Abb. 2.29.**). Dieses kann auf das aktivierende Potential von p65 zurückgeführt werden. Durch die Gabe eines NRF-Fusionsproteins, welches über Gal4 mit dem Reporterplasmid in Interaktion treten konnte, wurde die Expression konzentrationsabhängig und spezifisch reduziert (**Abb. 2.29.**). Dabei wurde eine maximale Inhibition um bis zu 75 % nach Transfektion von 7,5 μ g des Effektorplasmids pGalNRF1 beobachtet. Dieser Vektor kodierte für das C-terminal verkürzte NRF(1-380) (s. **Tab. 2.3.**). Erstaunlicherweise konnte keine Inhibition nach Expression des Fusionsproteins, welches die vollständige Aminosäuresequenz von NRF aufwies, beobachtet werden (**Abb. 2.30.**).

Dagegen konnte eine reprimierende Wirkung bei beiden eingesetzten NRF-Proteinen detektiert werden (**Abb. 2.32.**), wenn keine artifizielle Bindungsstelle auf dem Reporterplasmid, sondern das für NRF spezifische NRE eingesetzt wurde. Hierfür konnte NRF, das nicht mit Gal4 fusioniert wurde, verwendet werden.

Der fehlende inhibitorische Effekt des die vollständige Aminosäuresequenz enthaltenden Gal4-NRF-Fusionsproteins könnte auf sterische Hinderungen zurückzuführen sein. So könnte durch Faltungen innerhalb des NRF der DNA-bindende Gal4-Bereich zumindest teilweise verdeckt worden sein. Durch die nicht erfolgte Bindung an das Reporterplasmid konnte das NRF-Fusionsprotein demzufolge nicht an den überexprimierten Interaktionspartner p65-LexA binden. Eine inhibitorische Wirkung auf die Genexpression unterblieb. Andererseits könnte Gal4 die Interaktionsdomäne auf NRF(1-690), jedoch nicht auf NRF(1-380), maskiert haben. Durch diese Maskierung wäre eine Bindung an das Reporterplasmid und ein reprimierender Effekt durch Protein-Protein-Interaktion nicht möglich gewesen.

Prinzipiell geht aus den Reporterexperimenten hervor, dass NRF(1-380) und NRF(1-690) durch Interaktion mit p65 einen reprimierenden Einfluss auf die Genexpression ausübten. Nach Einsatz des Vektors pGalNRFd1, der für die Aminosäuren 1-298 auf NRF kodierte, konnte bereits kein Effekt nachgewiesen werden. So wirkten ausschließlich NRF-Fusionsproteine, die die vollständige minimale Interaktionsdomäne mit p65 enthielten, modulierend auf die transkriptionelle Aktivität des Reportergens. Es kann vermutet werden, dass dieser Bereich auf NRF nicht nur für Proteininteraktionen, sondern auch für die Regulation der Promotoraktivität wesentlich ist.

3.1.8. Detektion der partiellen Inhibition der NRF-p65-Bindung durch für die minimale Interaktionsdomäne von NRF spezifischen Peptiden *in vitro*

Synthetisierte Peptide können spezifisch in verschiedene Signalwege innerhalb der Zelle eingreifen und so die Funktionen bestimmter Proteine modulieren. Dabei lassen sich aus der Literatur mehrere Beispiele entnehmen. So konnte mittels Peptiden aus der p65-Sequenz die induzierte NF- κ B-Aktivierung sowie die durch NF- κ B vermittelte Genexpression gehemmt und die durch Tumornekrosefaktor (TNF) stimulierte Apoptose verstärkt werden (Takada *et al.*, 2004). In einem anderen Beispiel konnte die durch Stimuli hervorgerufene Aktivierung von NF- κ B und die hiervon abhängige Gen-

expression mittels Peptiden aus der NEMO (für: NF- κ B essential modifier)-bindenden Domäne der I κ B Kinasen (IKKs) inhibiert werden (May *et al.*, 2000).

Auch hier war ein Ziel der durchgeführten Arbeiten, die durch NRF regulierte Transkriptionsaktivierung mittels synthetisierter Peptide zu modulieren.

Als Ausgangspunkt für die Experimente wurden die Ergebnisse der Eingrenzung der minimalen NRF-p65-Interaktionsdomäne auf NRF herangezogen (s. 2.4.1.).

Für diese Versuche wurden fünf Peptide synthetisiert, wobei die Peptide A-D einen Bereich der minimalen Bindedomäne auf NRF wiedergaben. Das Peptid X diente als Kontrolle und repräsentierte einen Abschnitt auf NRF, der N-terminal außerhalb dieses Interaktionsbereichs lokalisiert war. Nach Zugabe je eines dieser Peptide im Überschuss zu den Kern- und Cytosolfractionen wurde das TAP-Aufreinigungsprotokoll (4.2.2.1.) durchgeführt.

Die hieraus ermittelten Ergebnisse zeigen, dass Peptide, die für einen Bereich innerhalb der minimalen Interaktionsdomäne spezifisch waren, die NRF-p65-Interaktion partiell inhibieren konnten (**Abb. 2.21.**). Diese qualitativen Aussagen konnten aufgrund der Bandenstärke der p65-Proteinbande im Vergleich zu der nach Zugabe des Peptids X bzw. des Ansatzes ohne Peptid getroffen werden. Bei diesen Kontrollen waren die detektierten p65-Banden vergleichsweise stark. Das N-terminal gelegene Peptid A inhibierte die NRF-p65-Interaktion jedoch nur schwach. Wesentlich stärkere, partielle Inhibitoren stellten die Peptide B und D dar.

Sequenzvergleiche unter Berücksichtigung der Polarität und Ladung der einzelnen Aminosäuren der drei verwendeten Peptide A, B und D verdeutlichten, dass positive und negative Ladungen auf dem Peptid B und D akkumuliert vorlagen. Anders als bei dem Peptid A waren polare Seitenketten in den Peptiden B und D kaum vorhanden.

Die Verteilung der polaren bzw. geladenen Seitenketten entlang des Interaktionsbereichs sind jedoch entscheidend für die Bindung. So geht aus der Literatur hervor, dass hydrophile Effekte, wie Wasserstoffbrückenbindungen und ionische Wechselwirkungen, bei Proteininteraktionen eine wesentlich bedeutendere Rolle spielen als bei Proteinfaltungsprozessen (Xu *et al.*, 1997a). Dabei ist für die Interaktion der Bindungspartner nicht nur die geometrische Komplementarität, sondern auch die der Aminosäuren, die in hydrophile Effekte involviert sind, entscheidend und für einzelne Interaktionen spezifisch (Xu *et al.*, 1997b).

Unter Berücksichtigung dieser Aspekte ist es möglich, dass die Verteilung der Wasserstoffbrückenbindungen und ionischen Wechselwirkungen der eingesetzten Peptide für ihre Inhibitionseigenschaften ausschlaggebend gewesen sein könnten. Möglicherweise deckten beide Peptide einen für die Interaktion mit p65 wichtigen Bereich auf NRF ab. In diesem Zusammenhang können weiterführende Aussagen über die geometrische Passgenauigkeit der Proteine im Interaktionsbereich nicht geliefert werden, da für diesen Sequenzabschnitt von NRF kein berechnetes, dreidimensionales Modell vorliegt.

Mit Hilfe des Programms „Receptor Binding Domain Finder“ (RBDfinder) der Nano+ Bio-Center Annotation Suite (NBCAS), können potentielle Rezeptorbindedomänen (RBD), die in Proteininteraktionen involviert sein können, ohne die Kenntnis zusätzlicher, struktureller Informationen ermittelt werden. Die Analyse erfolgt dabei unter Auswertung der Verteilung der hydrophoben Eigenschaften einer Sequenz (Gallet *et al.*, 2000). Als Basis dient die von Eisenberg *et al.* (1984) entwickelte Tabelle der Hydrophobie der Aminosäureseitenketten.

Nach Analyse der minimalen Interaktionsdomäne von NRF durch den RBDfinder konnte eine α -helikale Region, die die Aminosäuren RDRATELAVKLLQKRIEVRVV RRKFKH (an Position 61-87 auf NRF) umspannte, auf potentielle RDB-Regionen untersucht werden. Die Daten der Analyse sind in Abb. 3.1. zu sehen.

Aus **Abb. 3.1. (A)** geht hervor, dass die Aminosäuren VVRRK (Position 80-84) als mögliche RBD identifiziert werden konnten. Sie könnten somit für eine Interaktion mit potentiellen Bindungspartnern von NRF wesentlich sein und als sogenannte „hot spots“ fungieren (Fry & Vassilev, 2005). Diese so bezeichneten Aminosäuren innerhalb eines Bindebereichs sind für die Schlüsselinteraktionen eines Proteins unerlässlich. Interessanterweise lagen diese vier Aminosäuren innerhalb der Aminosäuresequenz des Peptids D, welches die NRF-p65-Bindung vergleichsweise stark schwächen konnte. So könnte die detektierte Inhibition durch dieses Peptid auf diese Aminosäuren zurückzuführen sein. Dabei könnte das Peptid in die Bindung von NRF mit p65 interkalieren und einen für die Interaktion wesentlichen Bereich auf NRF verdecken.

Abb. 3.1. (B) stellt die ermittelten Daten in graphischer Form dar. Dabei wird der hydrophobe Moment (μ) in Abhängigkeit von der Hydrophobie (H) der einzelnen Aminosäuren aufgetragen. Die Hydrophobie ist ein Maß für die Stärke der hydrophoben Eigenschaften der Seitenketten einzelner Aminosäuren. Der hydro-

phobe Moment wiederum ist ein Maß für die Amphiphilität der Aminosäuren (Eisenberg *et al.*, 1984). Die Amphiphilität beschreibt die strukturellen und chemischen Gegensätze innerhalb eines Moleküls. Diese konträren Eigenschaften können z.B. Aspekte wie hydrophil/hydrophob beinhalten.

In der graphischen Darstellung ist die RBD-Region durch eine blaue Abgrenzung hervorgehoben. Aminosäuren innerhalb dieses Bereichs besitzen eine geringe Hydrophobie und einen hohen hydrophoben Moment. Sie sind potentiell an der Proteininteraktion beteiligt (Tanuma *et al.*, 2004).

A

Sequence length: 27

Window size: 7

Fragment: RDRATELAVKLLQKRIEVRVRRKFKH

Header	i	Residue	Pred	< H _i >	< μ _{hi} >	RBD Area
61	ARG (R)	h	0.00	0.00	F	
62	ASP (D)	h	0.00	0.00	F	
63	ARG (R)	h	0.00	0.00	F	
64	ALA (A)	h	-0.61	0.19	F	
65	THR (T)	h	-0.32	0.37	F	
66	GLU (E)	h	-0.14	0.31	F	
67	LEU (L)	h	-0.05	0.26	F	
68	ALA (A)	h	-0.01	0.27	F	
69	VAL (V)	h	0.09	0.34	F	
70	LYS (K)	h	0.08	0.33	F	
71	LEU (L)	h	-0.15	0.46	F	
72	LEU (L)	h	-0.44	0.31	F	
73	GLN (Q)	h	-0.41	0.35	F	
74	LYS (K)	h	-0.34	0.27	F	
75	ARG (R)	h	-0.34	0.25	F	
76	ILE (I)	h	-0.67	0.22	F	
77	GLU (E)	h	-0.49	0.39	F	
78	VAL (V)	h	-0.26	0.45	F	
79	ARG (R)	h	-0.26	0.42	F	
80	VAL (V)	h	-0.61	0.59	T	
81	VAL (V)	h	-0.68	0.55	T	
82	ARG (R)	h	-0.67	0.58	T	
83	ARG (R)	h	-0.58	0.48	T	
84	LYS (K)	h	-0.71	0.49	T	
85	PHE (F)	h	0.00	0.00	F	
86	LYS (K)	h	0.00	0.00	F	
87	HIS (H)	h	0.00	0.00	F	

In RBD Area:

T : True

F: False

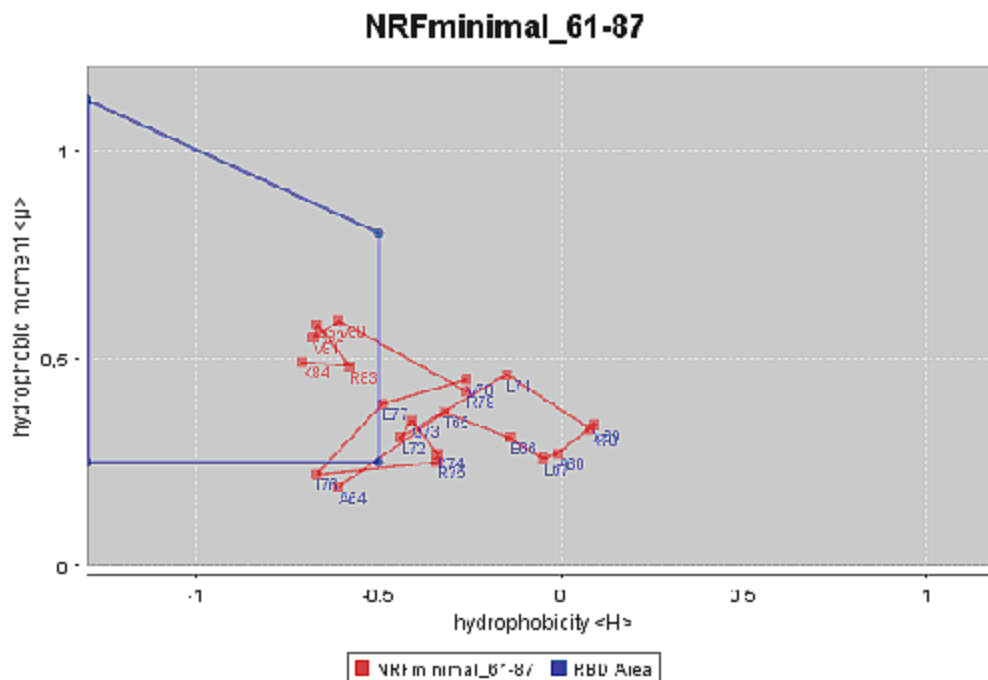
B

Abb. 3.1. Resultate nach Analyse der minimalen Interaktionsdomäne von NRF auf potentielle Rezeptorbindedomänen (RBD)

(A) Analyse des α -helikalen Bereichs der Aminosäuren 61-87 von NRF auf mögliche RBD.
 (B) Graphische Darstellung dieses α -helikalen Abschnitts. Der hydrophobe Moment (μ) wurde in Abhängigkeit von der Hydrophobie (H) der Aminosäuren aufgetragen.

3.1.9. Charakterisierung der Inhibition der induzierten Genexpression von IL-8 und IFN- β durch synthetisierte Peptide

Die Wirkung der synthetisierten Peptide auf endogene, NRF-regulierte Promotoren und daraus resultierend auf die Genexpression wurde beispielhaft an IL-8 und IFN- β untersucht. Die Promotoren beider Gene enthalten NRF-bindende DNA-Elemente (NRE) (Nourbakhsh *et al.*, 2001).

Vor dem Einbringen der verschiedenen Peptide in lebende Zellen wurden diese stimuliert (s. 4.2.1.4.). Für die Versuche des Effektes auf die IL-8-Genexpression wurde zuvor mit dem spezifischen Stimulus IL-1 induziert. Die Experimente des Einflusses der Peptide auf die Expression des IFN- β -Gens erfolgten nach Aktivierung durch den Virus NDV.

3.1.9.1. Etablierung der Peptidnukleofektionen

Für den Transfer der Peptide direkt in den Zellkern wurden Nukleofektionen (s. 4.2.1.5.) durchgeführt. Hierdurch ist es möglich, die Peptide ohne den Zusatz weiterer Substanzen unmittelbar an die entsprechenden Promotoren zu befördern.

Peptide könnten alternativ über zellpermeable Internalisierungssequenzen in die Zelle gelangen. Diese sogenannte Proteintransduktion (Schwarze & Dowdy, 2000) durch die Zellmembran ohne besondere Transportsysteme oder Hilfsproteine der Zelle wurde bereits mehrmals erfolgreich für die Inhibition von Protein-Protein-Interaktionen eingesetzt (Takada *et al.*, 2004). Zu den Proteinen, die diese Transduktionseigenschaften aufweisen, zählt das TAT-Protein des HIV-1 (Green & Loewenstein, 1988) oder der Transkriptionsfaktor ANTP (Antennapedia) aus *Drosophila* (Joliot *et al.*, 1991).

Jedoch bestehen die Vorteile von Nukleofektionen darin, dass der Peptidtransfer ohne Fusion des entsprechenden Peptids mit Internalisierungssequenzen erfolgen kann. So können unspezifische Wirkungen, die z.B. durch sterische Hinderungen hervorgerufen werden, bei Nukleofektionsversuchen ausgeschlossen werden. Zudem sollte das Peptid direkt in den Zellkern überführt werden. Bei der Proteintransduktion hingegen muss das Peptid auf dem Weg in den Zellkern das Cytosol passieren. Hierbei könnten Abbauprozesse die Konzentration des Peptids und somit die Effizienz des Transfers schwächen. Zudem kann ein über Internalisierungssequenzen in die Zellen eingeschleustes Peptid nahezu ungehindert in Zellen und Geweben diffundieren (Schwarze *et al.*, 1999). Ein gerichteter Transport in bestimmte Kompartimente der Zelle ist dadurch erschwert.

Für die Auswahl der für die Versuche eingesetzten Zelllinie wurden HeLa ACC 57- und HeLa B-Zellen (Gossen & Bujard, 1992) mit einem mit Fluorescein (FITC) gekoppelten Peptid B, als Peptid F bezeichnet, nukleofektiert. Die Daten aus fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zeigen, dass eine deutlich bessere Nukleofektionseffizienz in HeLa B-Zellen festgestellt werden konnte (**Abb. 2.33.**). Aufgrund dieser Resultate wurden HeLa B-Zellen für die weiteren Experimente verwendet.

Jedoch war auch nach Nukleofektion von HeLa B-Zellen die Effizienz relativ gering. Nach Elektroporation des Peptids F und anschließender Abschätzung des Fluoreszenzsignals mittels Densitometrie wiesen lediglich etwa 36 % der eingesetzten

Zellen eine für die Versuche als ausreichend vermutete Nukleofektionsrate auf (**Abb. 2.34.**).

Für die Nukleofektionsversuche wurde angenommen, dass ein Effekt der Peptide nach maximaler Aktivierung der Genexpression am deutlichsten nachgewiesen werden konnte. Aus diesem Grund wurde für die Optimierung der Versuchsbedingungen in HeLa B-Zellen eine Stimulationsreihe durchgeführt. Drei Stunden nach Induktion und jeweils in einem Abstand von einer zusätzlichen Stunde wurde die RNA aus den Zellen isoliert (s. 4.2.4.8.), eine reverse Transkription (RT) (s. 4.2.4.9.) und anschließend eine Polymerasekettenreaktion (PCR) (s. 4.2.4.10.) mit spezifischen Primern gefahren.

Aus den gewonnenen Ergebnissen kann entnommen werden, dass die IL-8-Genexpression drei Stunden nach Stimulation am stärksten aktiviert wurde (**Abb. 2.35. (A)**). Die Transkription des IFN- β -Gens erfolgte zeitlich versetzt erst sieben Stunden nach der Induktion (**Abb. 2.35. (B)**). Auf der Basis dieser Daten wurden drei Stunden nach Stimulation mit IL-1 sowie sieben Stunden nach Stimulation mit NDV die RNA aus den Zellen isoliert.

Auffallend war jedoch die zeitlich stark verspätete Aktivierung des IFN- β -Gens sowie die geringe Stärke der Genexpression. Dabei geht aus **Abb. 2.36.** hervor, dass die Aktivierung des Gens nach Stimulation mit NDV in HeLa ACC 57-Zellen wesentlich stärker war als in HeLa B-Zellen. Somit könnte die induzierte Transkription von IFN- β maßgeblich von dem verwendeten Zelltyp abhängig gewesen sein.

Bei den hier kultivierten HeLa B-Zellen handelt es sich um Zellen, die stabil einen Tetracyclin kontrollierten Transaktivator (tTA) exprimieren (Gossen & Bujard, 1992). Ein minimaler Promotor, der mit einer Sequenz des Tetracyclinoperators (*tetO*) fusioniert wurde, steht unter der Kontrolle eines Hybridtransaktivators. Dieser besteht aus dem Tetracyclinrepressor (*tetR*), der mit der C-terminalen Domäne des viralen Proteins 16 (VP16) des Herpes simplex Virus Typ 1 (HSV-1) kombiniert wurde.

Eine Vermutung ist, dass sich die in diesen Zellen vorhandene VP16-Domäne negativ regulierend auf die Aktivierung des Cytokins IFN- β ausgewirkt haben könnte. So konnte gezeigt werden, dass HSV-1 die frühe antivirale Cytokinexpression durch Destabilisierung der mRNA proinflammatorischer Gene, darunter auch IFN- β , schwächt (Mogensen *et al.*, 2004). Diese Inhibition wurde durch sehr früh nach Infektion transkribierter, viraler Gene in Abhängigkeit von VP16 vermittelt. So konnte bei einem veränderten Virus, dem ein funktionales VP16 fehlte, keine Inhibition der

Genexpression festgestellt werden. Aufgrund dieser Kenntnisse könnte die sehr schwache und zeitlich verzögerte IFN- β -Genexpression der hier verwendeten HeLa B-Zellen auf den negativ regulierenden Einfluss der vorhandenen VP16-Domäne zurückgeführt werden.

Die anschließenden Nukleofektionsversuche wurden ausschließlich mit induzierten Zellen vorgenommen. Experimente im nicht induziertem Zustand erfolgten nicht, da bereits die Behandlung der HeLa B-Zellen mit Nukleofektionsreagenz allein eine unspezifische Transkriptionsaktivierung hervorrief (**Abb. 2.37.**). Effekte nukleofektierter Peptide wären nicht nachweisbar gewesen.

3.1.9.2. Nachweis der Repression der induzierten Genexpression durch für die minimale Interaktionsdomäne von NRF spezifischen Peptide

Nach Stimulation der Zellen und Nukleofektion mit den einzelnen Peptiden wurde die RNA auf Basis der ausgeführten Vorarbeiten isoliert und eine RT-PCR durchgeführt. Hierfür wurden die für die Experimente *in vitro* (s. 2.5.1.) verwendeten Peptide (mit Ausnahme des Peptids A), das Peptid F sowie ein weiteres Peptid E eingesetzt. Das Peptid E enthielt eine willkürlich vertauschte Sequenz des Peptids B und diente als Negativkontrolle.

Die in der Arbeit ermittelten Daten zeigen einen inhibierenden und spezifischen Einfluss der Peptide, die einen Bereich der minimalen Interaktionsdomäne von NRF und p65 wiedergaben. So konnte eine um 40 % geringere IL-1 induzierte IL-8-Genexpression nach Nukleofektion der Peptide B, D und F beobachtet werden (**Abb. 2.39.**). Die Peptide E und X wiesen keine Repression der Genaktivierung auf.

Um diese Daten zu validieren, wurden vier unabhängige Nukleofektionen jeweils mit dem Peptid E und F vorgenommen. Übereinstimmend konnte auch hier eine Inhibition der Transkription von IL-8 durch das Peptid F, jedoch nicht durch das Peptid E, nachgewiesen werden (**Abb. 2.40.**).

Wie bereits ausgeführt, übt NRF nach Bindung an die Erkennungssequenz NRE und über direkte Protein-Protein-Interaktion mit p65 eine duale Funktion auf den IL-8-Promotor aus (Nourbakhsh *et al.*, 2001). Dabei wirkt NRF nach Stimulation mit IL-1 koaktivierend auf die IL-8-Genaktivierung. Hierfür ist die DNA-Bindung von NRF

entscheidend, da eine Mutation in dem NRE die IL-1 induzierte Expression hemmte (Nourbakhsh *et al.*, 2001).

Nach Stimulation wird die Transkription des IL-8-Gens durch synergistische Bindung der Transkriptionsfaktoren aktivierendes Protein-1 (AP-1), C/EBP (für: CCAAT/Enhancer-binding protein) und NF- κ B induziert (Wu *et al.*, 1997). Dabei kann die Beteiligung dieser Proteine an der aktivierten Genexpression von Zelltyp zu Zelltyp variieren. Die Bindung von NF- κ B an den IL-8-Promotor konnte hier jedoch gleichbleibend beobachtet werden (Wu *et al.*, 1997; Yasumoto *et al.*, 1992). Hiernach übt die Assoziation von NF- κ B an den Promotor wahrscheinlich eine Schlüsselfunktion während der induzierten Transkriptionsaktivierung von IL-8 aus. Durch Bindung an p65 könnte NRF ebenfalls eine wesentliche Funktion in der Kontrolle der Aktivität des IL-8-Promotors einnehmen.

Eine Interkalation der nukleofektierten Peptide B, D und F in den Bindebereich von NRF mit p65 könnte die koaktivierende Funktion von NRF auf den IL-8-Promotor schwächen. So könnte durch die teilweise Blockade der NRF-p65-Interaktion ein für die optimale Induktion der Genexpression aktivierter Prozess gehemmt werden.

Die im Rahmen der Arbeit ermittelte Inhibition der Transkriptionsaktivierung durch die verwendeten Peptide ist nicht stark ausgeprägt. Unter Berücksichtigung der geringen Nukleofektionseffizienz (**Abb. 2.34.**) kann jedoch von einem in nahezu allen erfolgreich nukleofektierten Zellen aufgetretenen Effekt ausgegangen werden. Somit wäre die Effizienz der im Zellkern lokalisierten Peptide sehr hoch. Diese Überlegungen könnten darüber hinaus die bedeutende Rolle von NRF auf die Genexpression von IL-8 unterstreichen.

Im Gegensatz zu den beschriebenen Daten des Einflusses synthetisierter Peptide auf die IL-8-Genexpression war der nachgewiesene Effekt auf die Transkriptionsaktivierung von IFN- β gering (**Abb. 2.42.**). In Einzelexperimenten konnte zwar eine Inhibition durch das Peptid F detektiert werden (**Abb. 2.41. (A)**), jedoch wies das Peptid F aufgrund der Fluoresceinmarkierung einen höheren Reinheitsgrad auf. Ein direkter Vergleich mit den verwendeten Negativkontrollen war somit nicht möglich.

Die fehlende Inhibition könnte teilweise auf die unzureichende Transkriptionsaktivierung des IFN- β -Gens nach Virusinduktion zurückgeführt werden (s. **Abb. 2.35.**). Durch eine nicht optimale Stimulation könnten diese, aufgrund der geringen Nukleo-

(A) Vorläufiges Modell der NRF vermittelten basalen Repression der Genexpression im unstimuliertem Zustand. (B) Schematische Darstellung des hypothetischen Ablaufs der NRF regulierten Genaktivierung nach Induktion

Dieses Modell basiert auf der dualen Funktion von NRF, wie sie beispielsweise für den IL-8-Promotor beschrieben wurde (Nourbakhsh *et al.*, 2001).

Im Rahmen der erfolgten Interaktionsuntersuchungen von NRF mit weiteren Faktoren der Transkriptionsmaschinerie konnte ausschließlich eine Bindung von NRF mit p65 (s. 2.2.1.) und NELF-E (s. 2.3.3.) nachgewiesen werden. NRF könnte somit sowohl auf die Transkriptionsinitiation als auch auf die -elongation regulierend wirken, was in dem dargestellten Modell berücksichtigt worden ist.

Die Promotoren, die Bindungssequenzen für NF- κ B und NRF enthalten, sind konstitutiv inhibiert (**Abb. 3.2. (A)**). Diese negative Regulation basiert auch auf einer direkten Interaktion zwischen NRF und NF- κ B (Nourbakhsh & Hauser, 1999). Beide binden an spezifische Bindestellen im Promotorbereich. Dabei interagiert NRF mit der Konsensussequenz NRE. Wie in 3.1.2. und 3.1.3. zusammengefasst ist, wird diese Interaktion über eine minimale Bindungsdomäne von Aminosäure 204-308 auf NRF und der Rel-Homologie-Domäne (RHD) von NF- κ B (p65) vermittelt. Aus den im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnissen ist bisher nicht bekannt, dass weitere initiale Faktoren der Transkriptionsmaschinerie an dieser Bindung beteiligt sind (s. 3.1.4.). Der negative Effekt von NRF auf Promotoren in unstimulierten Zellen wird über Interaktion mit der Untereinheit E des negativen Elongationsfaktors NELF verstärkt. Dieser Faktor reprimiert nach Assoziation an die große Untereinheit Spt5 von DSIF und an die RNA-Polymerase II (Pol II) die Transkriptionselongation (Yamaguchi *et al.*, 1999). Dabei ist DSIF ein heterodimerer Elongationsfaktor, der aus den Untereinheiten Spt4 und Spt5 aufgebaut ist (s. 1.4.1.1.). NELF-E scheint für eine Stabilisierung des Komplexes aus DSIF, NELF und Pol II und für eine Ausübung der inhibitorischen Funktion von NELF unerlässlich zu sein (Narita *et al.*, 2003). NRF könnte durch Bindung an NELF-E eine Stabilisierung des formierten Komplexes und somit den inhibitorischen Effekt verstärken. Darüber hinaus wurde bei Dreikhausen *et al.* (2005) nachgewiesen, dass die basale Repression der Elongation am viralen HIV-1 LTR über Verhinderung der Rekrutierung von DSIF durch NRF reguliert wird. Unter Berücksichtigung diesen Aspektes ist DSIF in der **Abb. 3.2. (A)** halbtransparent dargestellt.

Im nicht induzierten Zustand liegt NRF konstitutiv phosphoryliert (P) vor. Wie in **Abb. 3.2. (B)** durch ein fehlendes „P“ angedeutet wird, wird NRF nach Induktion kurzzeitig

dephosphoryliert (persönliche Mitteilung S. Rother). Wie am Beispiel von IL-8 gezeigt wurde (Nourbakhsh *et al.*, 2001), geht eine Stimulation mit IL-1 mit einer Umkehrung der reprimierenden Funktion von NRF in eine koaktivierende einher. Das wird in der Abbildung durch einen Pfeil, der in Richtung der fortschreitenden Transkription weist, verdeutlicht. Trotz weiter bestehender Bindung von NRF an NF- κ B wird das inhibitorische Potential dieser Interaktion aufgehoben. Es konnten jedoch keine Veränderungen in der Bindungsstärke zu NF- κ B als auch des Interaktionsbereichs auf NRF beobachtet werden (s. 2.2.2.). Darüber hinaus bleibt die Assoziation von NRF mit NELF-E erhalten. Auch hier veränderte sich nach Stimulation weder die Binde-domäne auf NRF noch die Bindungseffizienz mit NELF-E (s. 2.3.3.). Der ternäre Komplex von NELF, DSIF und der Pol II liegt dissoziiert vor. Möglicherweise wird durch Interaktion von NRF mit NELF-E die Formation des Komplexes aus DSIF, NELF und Pol II verhindert. Dieses könnte auf Änderung der RNA-bindenden Eigenschaften von NELF-E zurückgeführt werden. Hierbei könnten auch die mit Nukleinsäuren interagierenden Domänen im C-terminalen Bereich von NRF einen Effekt ausüben. Die fortschreitende Transkription ist mit einer Hyperphosphorylierung (PP) der carboxyterminalen Domäne der Pol II verbunden. Dabei liegt die ebenfalls phosphorylierte (P) große Untereinheit Spt5 von DSIF mit der Pol II assoziiert vor (Sims *et al.*, 2004).

Weiterführende Untersuchungen bezüglich der Interaktion von NRF mit weiteren Proteinen, dem Phosphorylierungsstatus des Proteins und den RNA-bindenden Eigenschaften könnten ein umfassenderes Bild der NRF kontrollierten Transkriptionsaktivierung liefern.

4. Material und Methoden

4.1. Materialien

4.1.1. Geräte

- *Elektrophorese-, Western Blot- und Darstellungssysteme*

Agarosegeldokumentation	BioDoc Analyze + Software (Biometra) Gel Doc 1000 (Bio-Rad)
Elektrophoresekammer	semidry elektroblotter HEP-1/HEP-3 (Panther)
Gelkammer	(Sigma)
Filmentwickler	Optimax (Protec)

- *Inkubatoren und Schüttler*

Bakterien Inkubator	B5050E (Heraeus)
Schüttler	The Belly Dancer (Stovall) intelli mixer (Neolab) REAX top (Heildorph)
Schüttel-Inkubator	Certomat H + R (B. Braun)
Zellinkubator	CO ₂ Auto Zero (Heraeus)

- *Kühl- und Heizsysteme*

Eismaschine	(Ziegra)
Heizblock	Test Tube Thermostat TCR100 (Roth)
Kühlschrank 4 °C	(Liebherr)
Kühlschrank -20 °C	(Liebherr)
Kühlschrank -80 °C	VIP Series (Sanyo)
Kühltruhe -80 °C	Advantage (Nunc)
Thermozykler	Thermocycler (Landgraf)

- *Mikroskope und Photometer*

Mikroskope	950405 (Olympus)
	Laborlux 12 (Leitz)
	Axiovert 200M (Zeiss)
Photometer	UV160A (Shimadzu)

- *Zentrifugen*

Kühlzentrifugen	J2-21 (Beckman)
	3K12, 2K15 (Sigma)
	RT 6000B (Sorvall)
Tischzentrifugen	Biofuge pico (Heraeus)
	Biofuge 13 (Heraeus)
	Microcentrifuge MC-13 (Millipore)

- *Verschiedene, verwendete Geräte*

Netzgerät	EPS 301 (Amersham pharmacia biotech)
Nukleofektionsgerät	Nucleofector I (Amaxa Biosystems)
Pipetten 0,5-10 µl; 10-100 µl; 100-1000 µl	(Eppendorf Research)
Pipettierhilfe	Pipetboy (Integra Biosciences)
Sterilwerkbank	Hera Safe (Heraeus Instruments)
UV Tisch	(Bachhofer)
Vakuumtrockner	Speed Vac SVC 100 (Savant)
Wasserbäder	42 °C (VWR), 37 °C (Köttermann)
Wasserfiltrationsanlage	Milli Q _{UF} Plus (Millipore)

4.1.2. Verbrauchsmaterialien

Bakterienkulturschalen 92 mm	Sarstedt
Einwegküvetten	Sarstedt
Einwegpipetten 25, 10, 2 ml	Sarstedt
Filterpapier 3MM-Chromatographiepapier	Whatman
Filme	Kodak

Kulturflaschen T75	Greiner bio-one Cellstar
Kulturschalen 145 mm	Greiner bio-one Cellstar
Kulturschalen 35 mm	Nunc
Kunststoffklarsichtröhrchen 5 ml	Sarstedt, Elkay Laboratories
Kunststoffröhrchen 10 ml	Greiner
Kunststoffröhrchen 15 ml	Nunc
Kunststoffröhrchen 50 ml	Greiner
Pipettenspitzen 0,5 - 20 µl	Eppendorf epTIPS standard
Pipettenspitzen 10 - 200 µl; 100 - 1000 µl	Sarstedt
Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran	Millipore Immobilon
Reaktionsgefäße 0,5 ml	Landgraf
Reaktionsgefäße 2 ml, 1,5 ml	Eppendorf
Röntgenfilme 18 x 24 cm	Kodak
Skalpell	Feather
UV-Küvetten	Hellma

4.1.3. Chemikalien

Acrylamidlösung Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth GmbH & Co.
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma
Agarose NEEO Ultra-Qualität Roti-Garose	Carl Roth GmbH & Co.
2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol (Tris)	Sigma
2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol-Puffer (Tris-Puffer)	Carl Roth GmbH & Co.
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad
Ampicillin	Sigma
Aqua Spüllösung DeltaSelect (Wasser)	DeltaSelect GmbH
Bromphenolblau	Sigma
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	Sigma
Coenzym A	Fluka
Chloroform	J.T. Baker
Cytosintriphosphat (CTP)	Sigma
Dimethylsulfoxid	Fluka
Dithiothreitol (DTT)	Sigma

trans-Epoxy succinyl-L-Leucylamido-(4-Guanidino)- Butan (E64)	Sigma
Essigsäure	J.T.Baker
Ethanol	J.T. Baker
Ethidiumbromid	Invitrogen
Ethylendiaminotetraessigsäure (EDTA)	Merck
Ficoll	Biochrom AG
Formaldehyd	Merck
L-Glutamat	Gibco
Glycerin	Serva
Glycerol-2-phosphat	Sigma
Glycin	Carl Roth GmbH & Co.
Guanosintriphosphat (GTP)	Sigma
HCl, konzentriert (38%)	J.T. Baker
4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure (HEPES)	Sigma
(Octylphenoxy)polyethoxyethanol (IGEPAL)	Sigma
Imidazol	Merck
KCl	Sigma
KOH	Merck
LiCl	Sigma
Leupeptin	Sigma
Magermilchpulver	Sucofin
Magnesiumacetat	Fluka
β-Mercaptoethanol	Sigma
Methanol	J.T. Baker
2-Methylpropan-2-ol (Isobutylalkohol)	Merck
MgCl ₂	Sigma
MgSO ₄	Applichem
Mineralöl	Sigma
Micro-O-Protect	Roche
Na ₂ HPO ₄	Riedel de Haen
Na ₃ VO ₃	Sigma
NaCl	J.T. Baker

NaOH	Merck
Natriumdeoxycholat ($C_{24}H_{39}NaO_4$)	Sigma
Natriumdodecylsulfat (Sodiumdodecylsulfat, SDS)	ICN Biomedicals Inc.
Natriumpyrophosphat ($Na_4P_2O_7 \times 10 H_2O$)	Sigma
Nonidet P40	Fluka
Okadasäure	Alexis
Pepstatin A	Sigma
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
Polyethylenglykol 8000	Sigma
2-Propanol	J.T. Baker
RNase-Inhibitor Ribolock	Fermentas
Ribonuklease-Inhibitor RNasin®	Promega
Roti®-Blot A	Carl Roth GmbH & Co.
Roti®-Blot K	Carl Roth GmbH & Co.
Roti®-Load1 4x Konzentrat (Laemmli-Auftragspuffer)	Carl Roth GmbH & Co.
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	ICN, Biomedicals, Inc.
Stickstoff, flüssig	Linde
N, N, N', N'-Tetra-methyl-ethylendiamin (Temed)	Bio-Rad
Thymidintriphosphat (TTP)	Sigma
Triton X-100	Fluka
Trizol-Lösung	Invitrogen
Trypanblau-Lösung	PAA-Laboratories
Tween 20	Sigma
Xylencyanol FF	Sigma

4.1.4. Allgemeine Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Anodenpuffer	50 ml Roti®-Blot A, 350 ml H_2O dest., 100 ml Methanol
Calmodulin-Bindepuffer	50 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl, 10 mM β -Mercaptoethanol, 1 mM Magnesiumacetat, 1 mM Imidazol, 2 mM $CaCl_2$

DNA-Auftragspuffer (6x)	0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol FF, 15 % Ficoll, 0,1 M EDTA
HEBS-Puffer (2x)	0,28 M NaCl, 0,05 M HEPES, 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7,1
IPP-150-Puffer	10 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,1 % NP-40
Kathodenpuffer	50 ml Roti [®] -Blot K, 350 ml H ₂ O dest., 100 ml Methanol
PBS, 10 x Konzentrat	PAA Laboratories GmbH
Proteingel-Laufpuffer	250 mM Tris, 2 M Glycin, 1 % SDS
Proteingel-Auftragspuffer	s. 4.1.3 (RotiLoad Laemli-Auftragspuffer)
Puffer A (ChIP)	20 mM Tris pH 8,0, 0,1 % SDS, 1 % Triton X- 100, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl
Puffer B (ChIP)	20 mM Tris pH 8,0, 0,1 % SDS, 1 % Triton X- 100, 2 mM EDTA, 500 mM NaCl
Puffer C (ChIP)	10 mM Tris pH 8,0, 250 mM LiCl, 1 % IGEPAL, 1 % Natriumdeoxycholat, 1 mM EDTA
RIPA-Puffer	40 mM Tris pH 7,05, 120 mM Natriumpyro- phosphat, 200 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 8 mM Na ₃ VO ₄ , 2 mM NaF, 80 mM Glycerol-2- phosphat, 10 µg/ml Leupeptin, 1 mM PMSF, 10 µM Pepstatin
“Stripping-Buffer”	2,5 mM Glycin, 1 % SDS, pH= 2,0
TAE (50x)	2 M Tris, 0,05 % Essigsäure, 0,05 M EDTA
TE-Puffer (Elution)	10 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA, 1 % SDS
TE-Puffer (Waschen)	10 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA

TBS	100 mM Tris, 1,5 M NaCl, mit HCl auf pH 7,5
TBS-T	TBS, 5 % Tween 20
TEV-Protease-Spaltpuffer	10 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,1 % NP-40, 0,5 mM EDTA
Trypsin/EDTA-Lösung	2,5 % Trypsin, 0,01 % EDTA in PBS
TSS-Puffer	10 % PEG, 50 mM MgCl ₂ , 5 % DMSO in LB-Medium, pH 6,6
Zellysepuffer A	10 mM HEPES, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl ₂ , 0,3 mM Na ₃ VO ₃ , 20 mM Glycerol-2-phosphat, 10 µM E64, 2,5 µg/ml Leupeptin, 0,3 mM PMSF, 1 µM Pepstatin, 5 mM DTT, 400 nM Okadasäure, pH 7,9
Zellysepuffer A + Nonidet P40	(siehe oben) + 0,1 % Nonidet P40
Zellysepuffer B	20 mM HEPES, 0,42 mM NaCl, 1,5 mM MgCl ₂ , 0,3 mM Na ₃ VO ₃ , 20 mM Glycerol-2-phosphat, 0,2 mM EDTA, 25 % (v/v) Glycerin, 10 µM E64, 2,5 µg/ml Leupeptin, 0,3 mM PMSF, 1 µM Pepstatin, 5 mM DTT, 400 nM Okadasäure, pH 7,9

4.1.5. Gebrauchsfertige Reagenzien und Kits

Calmodulin Affinity Resin	Stratagene
Cell Line Nucleofector® Kit R	Amaxa
5 x First Strand Buffer	Invitrogen
GFX™ DNA and Gel Band Purification Kit	Amersham Biosciences
GFX™ Micro Plasmid Prep Kit	Amersham Biosciences
NucleoSpin Extract II	Macherey-Nagel
Nucleobond AX	Macherey-Nagel

QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
Rabbit-IgG-Agarose	Sigma
SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Pierce
SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate	Pierce
Thermo Pol (10 x)	NEB

4.1.6 DNA- und Proteinstandards

Precision Plus Protein™ Dual Color Standard [kDa]: 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150, 250	Bio-Rad
Smart ladder [bp]: 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 800, 600, 400, 200	Eurogentec
ΦX174 DNA/BSURI (<i>Hae</i> III) [bp]: 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72	Fermentas
λ DNA/ <i>Eco</i> RI + <i>Hind</i> III [bp]: 21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 564	Fermentas

4.1.7. Enzyme, Antikörper, Peptide, Cytokine und Viren

AcTEV-Protease	Invitrogen
CBP (C-20): sc-583	Santa Cruz Biotechnologie
c-Fos (H-125): sc-7202	Santa Cruz Biotechnologie
c-Jun (H-79): sc-1694	Santa Cruz Biotechnologie
DNAse	Promega
Goat anti-rabbit, Immunglobulins/HRP	Dako Cytomation
HDAC1 (H-11): sc-8410	Santa Cruz Biotechnologie
Interleukin (IL)- 1 (10 µg/ml)	Hoffman La Roche
Newcastle Disease Virus (NDV)	Lohmann animal Health
Klenow-Fragment	Fermentas
M-MLV-Reverse Transkriptase	Invitrogen
mSin3A (G-11): sc-5299	Santa Cruz Biotechnologie

NELF-E (KM2479)	Sendung von Handa <i>et al.</i>
NF-kB p50 (E-10): sc-8414	Santa Cruz Biotechnologie
NF-kB p65 (F-6): sc-8008	Santa Cruz Biotechnologie
PAP (Peroxidase anti-Peroxidase)-Antikörper	Sigma
Peptide (2 mg)	Eurogentec
Polyclonal rabbit anti-goat, Immunglobulins/ HRP	Dako Cytomation
Polyclonal rabbit anti-mouse, Immunglobulins/ HRP	Dako Cytomation
Proteinase K	Merck
SPT5 (H-300): sc-28678	Santa Cruz Biotechnologie
T4-DNA-Ligase	Roche/Promega
Taq-DNA-Polymerase und zugehöriger Puffer	NEB
TFIID (TBP) (N-12): sc-204	Santa Cruz Biotechnologie
Trypsin	Gibco

Restriktionsenzyme

Enzym	Standard-Puffer	
<i>Bam</i> HI	<i>Bam</i> HI-Puffer	Fermentas
<i>Eco</i> RI	<i>Eco</i> RI-Puffer	Fermentas
<i>Hind</i> III	Puffer R	Fermentas
<i>Hpa</i> I (<i>Ksp</i> AI)	Puffer B	Fermentas
<i>Nde</i> I	Puffer R	Fermentas
<i>Pst</i> I	Puffer O	Fermentas
<i>Pvu</i> I	Puffer R	Fermentas
<i>Sca</i> I	<i>Sca</i> I-Puffer	Fermentas
<i>Xba</i> I	Puffer Tango TM	Fermentas

4.1.8. Nukleinsäuren

definierte DNA-Oligonukleotide (Primer)	MWG und Operon
oligo(dT)	Pharmacia Biotech

- *Primer für die Herstellung der NRF-TAP-Fusionsproteine*

BNRF1071 5'-ACT AGT GGA TCC TTT GCT TGA GGC ATA ACA AGC-3'
 BNRF1773 5'-ACT AGT GGA TCC ACT CGA CAA CGC CAT GTG CG-3'
 BNRF2702 5'-ACT AGT GGA TCC TGT GAT GTG GTG CTT GGG-3'
 HNNRF654 5'-GAC CCA AGC TTC CAT GGA AAA AAT TCT CCA AAT GGC-3'

- *Primer für die Dephosphorylierung von NRF-TAP-Fusionsproteinen*

NRFPHOMU5 5'-GAG ACA TCG CCC AAG ATG CTA CTC AAG ACT CTT TCG
 CTA TAC AAG-3'
 NRFPHOMU3 5'-CTT GTA TAG CGA AAG AGT CTT GAG TAG CAT CTT GGG
 CGA TGT CTC-3'

- *Primer für die Herstellung von pcDNA3NRF1793TAPred1mut*

Myrmut5 5'-CGC TCG AGC ATG CAT CTA ACT CGT TGT ATT CAG GCG-3'
 Myrmut3 5'-CGC CTG AAT ACA ACG AGT TAG ATG CAT GCT CGA GCG-3'

- *Primer für die Chromatin-Immunopräzipitation*

IFNpro5 5'-CGT TTG CTT TCC TTT GCT TTC TCC C-3'
 IFNpro3 5'-GCA CAA CAG GAG AGC AAT TTG GAG G-3'
 IL8Prom5 5'-GGG CCA TCA GTT GCA AAT C-3'
 IL8Prom3 5'-TTC CTT CCG GTG GTT TCT TC-3'

- *Primer für die Reporterexperimente*

p65delEco-1 5'-GAG CCC ATG GAA TTT CAG TAC CTG CCA GAT ACA G-3'
 p65delEco-2 5'-CTG TAT CTG GCA GGT ACT GAA ATT CCA TGG GCT C-3'

- *Primer für die RT-PCR-Reaktionen*

GAPDHS 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3'
 GAPDHAS 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'
 HuIL-8s 5'-ACA TAC TCC AAA CCT TTC CAC CC-3'

HuLL-8as	5'-CAA CCC TCT GCA CCC AGT TTT C-3'
HIFNb141	5'-CAC GAC AGC TCT TTC CAT GA-3'
HIFNb385	5'-AGC CAG GAG GTT CTC AAC AA-3'

4.1.9. Kulturmedien und -agar

Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)	Difco™ Luria Bertani Broth, (Miller Becton Dickinson & Company)
Luria-Bertani-Agar (LB-Agar)	Standard I-Nähragar (Merck)
Zellkulturmedium	DMEM High Glucose (PAA Laboratories GmbH) mit 100 IU/ml Penicillin, 100 UG/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamat
Penicillin/Streptomycin-Lösung (10.000 IU/ml Penicillin, 10.000 UG/ml Streptomycin)	Gibco
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories GmbH

4.1.10. Zelllinien, Bakterienstämme und Plasmide

<i>Escherichia coli</i> XL-1-blue (<i>E. coli</i>)	Stratagene
HeLa Bujard (HeLa B)	H. Bujard, Universität Heidelberg
HeLa ACC 57	DSMZ

- *Verwendete Plasmide*

pcDNA3.1	Invitrogen
pcDNA3TAP	erhalten von M. Nourbakhsh
pNRF	erhalten von M. Nourbakhsh
pNRF2722TAP	erhalten von J. von der Ohe
pNRF1793TAP	erhalten von J. von der Ohe
pNRF1091TAP	erhalten von J. von der Ohe
pNRF2722TAPMut1	hergestellt von M. Bartels

pNRF1793TAPMut1	hergestellt von M. Bartels
pNRF1091TAPMut1	hergestellt von M. Bartels
pcDNA31793TAPred1mut	hergestellt von M. Bartels
p65	erhalten von M. Nourbakhsh
p65RHD	erhalten von R. Gräpel
pTA-Luc	Clontech
pL6G2CAT	erhalten von M. Nourbakhsh
pL6G2Luc	erhalten von A. Schweda
p65delEco	erhalten von A. Schweda
pLex	erhalten von M. Nourbakhsh
p65Lex	erhalten von A. Schweda
pGalNRFd3	erhalten von M. Nourbakhsh
pGalNRFd2	erhalten von M. Nourbakhsh
pGalNRFd1	erhalten von M. Nourbakhsh
pGalNRF1	erhalten von M. Nourbakhsh
pGalNRF	erhalten von A. Schweda
pGal4-VP16	erhalten von M. Nourbakhsh
pL6NCAT	erhalten von M. Nourbakhsh
pL6Nluc	erhalten von A. Schweda

4.1.11. Software

pDRAW32	AcaClone software
Windows XP Home Edition, 2000	Microsoft

4.1.12. Sonstiges

Cell Line Nukleofector Kit R	Amaya biosystems
GFX™ DNA and Gel Band Purification Kit	Amersham Biosciences
GFX™ Micro Plasmid Prep Kit	Amersham Biosciences
Nukleobond PC 500	Macherey Nagel
QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
SuperSignal® West femto Maximum Sensitivity	Pierce

Substrate Antibodys

SuperSignal® West pico Chemoluminescent Substrate	Pierce
Renilla Luciferase Assay System	Promega

4.2. Methoden**4.2.1. Arbeiten mit HeLa-Zellen****4.2.1.1. Kultivierung von HeLa-Zellen**

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden humane Zellen der Linien Hela Bujard (HeLa B) und HeLa ACC 57 eingesetzt. Die Zellen wurden in je 10 ml Zellkulturmedium und 5 % FCS (HeLa B) sowie 10 % FCS (HeLa ACC 57) bei 37 °C, 5 % CO₂ und unter Wasserdampfsättigung kultiviert. Hierfür wurden T75 Kulturflaschen (Greiner) verwendet. Alle drei bis fünf Tage wurden die Zellen im Verhältnis 1:8 bis 1:10 verdünnt. Dabei wurden die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und in 1 ml Trypsin-EDTA-Lösung (2,5 % Trypsin, 0,01 % EDTA in PBS) inkubiert, bis sie sich vom Boden der Kulturflasche lösten. Anschließend wurden die Zellen in der Menge Medium aufgenommen, die dem beschriebenen Verdünnungsverhältnis entsprach und erneut ausgesät.

Zur Zellzahlbestimmung wurden 20 µl der betreffenden Zellsuspension mit 20 µl Trypanblau-Lösung gemischt. Anhand einer Neubauer-Zählkammer wurde die Lebendzellzahl pro ml Lösung bestimmt.

4.2.1.2. Lagerung von HeLa-Zellen

Zur Lagerung wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin-EDTA-Lösung aus ihrer Kulturflasche gelöst und in etwa 10 ml Kulturmedium aufgenommen. Anschließend wurden sie für sieben Minuten bei 200 x g abzentrifugiert. Nach Abnahme des Mediums wurden die Zellen in FCS mit 10 % DMSO aufgenommen. Die Temperatur der

Suspension wurde langsam auf -70 °C herabgesetzt und die Zellen zur Lagerung in flüssigem Stickstoff überführt.

Für das Auftauen der verwendeten Zellen wurde die in flüssigem Stickstoff gelagerte Zellsuspension zunächst bei 37 °C erwärmt und dann auf Eis gestellt. Anschließend wurde 1 ml FCS langsam zugeführt. Die Zellen wurden dann in etwa 7 ml Medium mit 15 % FCS aufgenommen. Nach Zentrifugation für sieben Minuten bei 200 x g wurde das Zellpellet in Medium mit 15 % FCS überführt und ausgesät.

4.2.1.3. Transfektion von HeLa-Zellen

Während der durchgeführten Arbeiten wurden HeLa B-Zellen nach der Calcium-phosphat-Methode transfiziert.

Hierfür wurden am Tag vor der Transfektion die verwendeten Zellen in 20 ml Medium (Kulturschale mit 14,5 cm Durchmesser) bzw. 2ml Medium (Kulturschale mit 3,5 cm Durchmesser) mit 5 % FCS ausgesät. Es wurden 5×10^6 Zellen in einer Kulturschale mit 14,5 cm Durchmesser oder 4×10^5 in einer Kulturschale mit 3,5 cm Durchmesser eingesetzt. Eine Stunde vor der Transfektion wurde das Kulturmedium abgenommen und Medium mit 10 % FCS zugegeben.

Unmittelbar vor der Transfektion wurden bei einer Kulturschale von 14,5 cm Durchmesser je 120 µg der zu transfizierenden DNA in 1,25 ml 37 °C warmen CaCl_2 (0,25 M) überführt. Bei Transfektionen in 3,5 cm-Kulturschalen wurden variierende Mengen an DNA mit 120 µl 0,25 M CaCl_2 (37 °C) vermischt. Die DNA-haltige Lösung wurde daraufhin tropfenweise mit gleichem Volumen des ebenfalls 37 °C warmen 2 x HEBS-Puffers versetzt und zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. So konnte eine Fällung der DNA erfolgen. Anschließend wurde die Lösung auf die zu transfizierenden Zellen getropft. Nach Durchmischen des mit der gefällten DNA versetzten Mediums wurden die Zellen für 16 Stunden bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Danach wurde das Medium durch frisches, 10 % FCS enthaltendes ersetzt und die Zellen einen weiteren Tag kultiviert.

4.2.1.4. Stimulation von HeLa B-Zellen

Für die Untersuchungen wurden HeLa B-Zellen sowohl mit Interleukin (IL-1)-1 als

auch Newcastle Disease Virus (NDV) stimuliert. Die Induktion erfolgte zwei Tage nach Transfektion unmittelbar vor der Zellyse. Für die Nukleofektionen wurden Versuchszeiten, wie in 2.8.2. ermittelt, verwendet.

Bei Stimulation mit NDV wurden die Zellen 3 x mit serumfreien Medium gewaschen. Die Originallösung des Virus (Lohmann animal Health) wurde 1:100 in serumfreien Medium verdünnt. Anschließend wurden die Zellen für eine Stunde mit dem Virus enthaltenden Medium bei Standardbedingungen inkubiert. Für die Beendigung der Stimulation wurden die Zellen zweimal mit Medium mit 10 % FCS gewaschen und erneut für eine Stunde bei Standardbedingungen kultiviert.

IL-1 wurde in 10 % FCS enthaltenden Medium mit einer finalen Konzentration von 10 ng/ml eingesetzt. Die verwendeten HeLa B-Zellen wurden mit dem in Medium verdünnten IL-1 bei Standardbedingungen inkubiert.

Für die Interaktionsuntersuchungen wurden die Zellen für eine Stunde mit IL-1 kultiviert. Bei den Nukleofektionen wurden die Zellen für drei Stunden stimuliert. Die Induktion wurde durch mehrmaliges Waschen der Zellen mit Medium mit 10 % FCS bzw. 1 x PBS beendet.

4.2.1.5. Nukleofektion von HeLa B- und HeLa ACC 57-Zellen

Je Versuchsansatz wurden HeLa B- und HeLa ACC 57-Zellen, wie in 4.2.1.1 beschrieben, kultiviert und je 1×10^6 Zellen pro Versuchsansatz mit dem Cell Line Nukleofector Kit R nach der für die Zelllinie mitgelieferten Vorschrift (Amaxa biosystems) nukleofektiert. Eine Stunde vor der Nukleofektion wurden die Zellen in Medium mit 10 % FCS überführt.

Das nachfolgende Protokoll wurde sowohl in HeLa B als auch HeLa ACC 57-Zellen angewendet. Hiernach wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung von den Kulturfラスchen gelöst und in wenigen ml 10 % FCS enthaltenden Medium aufgenommen. Die Zellen wurden für zehn Minuten bei 200 x g abzentrifugiert. Anschließend wurde das Medium vollständig abgenommen und das Zellpellet durch leichtes Aufklopfen gelockert. 1×10^6 Zellen wurden in 100 µl des mitgelieferten Nukleofektionspuffers resuspendiert und mit den entsprechenden Peptiden gemischt. Die Zellsuspension wurde in eine Nukleofektionsküvette (Amaxa biosystems) überführt und im Nukleofektionsgerät mit dem Programm I-13 elektroporiert. Danach wurden die Zellen in 3,5 cm-Kulturschalen mit je 2 ml vorgewärmten und mit 10 % FCS versehenen

Medium überführt und für die entsprechende Zeit kultiviert. Für die Stimulationsuntersuchungen mit IL-1 wurden die nukleofektierten Zellen in 10 ng/ml IL-1 enthaltenden Medium mit 10 % FCS drei Stunden bei Standardbedingungen inkubiert.

Der Versuchsablauf der nukleofektierten und anschließend mit NDV stimulierten HeLa B-Zellen ist in 2.8.4. beschrieben.

Für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden die nukleofektierten HeLa B- und HeLa ACC 57-Zellen drei Stunden nach Nukleofektion 2 x mit warmen 1 x PBS (37 °C) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml 1 x PBS versehen und mikroskopiert. In der Zwischenzeit, bis zu der nachfolgenden mikroskopischen Beobachtung, wurden die Zellen in Medium mit 10 % FCS im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

4.2.1.6. Zelllyse

A. Herstellung von Cytosol- und Kernextrakten

Die hier aufgeführten Mengenangaben beziehen sich auf in Kulturschalen mit einem Durchmesser von 14,5 cm transfizierten HeLa B-Zellen (s. 4.2.1.3.).

Zwei Tage nach Transfektion wurden die Zellen dreimal mit kaltem (4 °C) 1 x PBS gewaschen, mit einem sterilen Zellschaber von der Schale gelöst und in 10 ml kaltem PBS aufgenommen. Die Zellen wurden anschließend für fünf Minuten bei 5000 x g und 4 °C abzentrifugiert und in 350 µl Zelllysepuffer A ohne NP-40 resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 300 µl Zelllysepuffer A mit 0,1 % NP-40 resuspendiert. Nachfolgend erfolgte eine Inkubation für zehn Minuten auf Eis. Die Lysate wurden erneut zentrifugiert (fünf Minuten, 10.000 x g, 4 °C) und der Überstand, die Cytosolfraktion, abgenommen und bei -20 °C gelagert. Das verbleibende Zellpellet wurde in 100 µl Zelllysepuffer B resuspendiert und für 60 Minuten auf Eis inkubiert, wobei die Zellsuspension regelmäßig geschüttelt wurde. Nach abschließender Zentrifugation für fünf Minuten bei 10.000 x g und 4 °C wurde der Überstand, die Kernfraktion, ebenfalls abgenommen und bei -20 °C gelagert.

Für die Untersuchungen des Einflusses inhibitorischer Peptide auf die NRF-p65-Interaktion wurden mehrere Kern- und Cytosolfractionen vor der Lagerung vereint und für weitere Experimente jeweils 100 µl Kern- bzw. 300 µl Cytosolfraction abgenommen. Schwankungen in der Transfektionseffizienz konnten so ausgeglichen

werden.

B. Lyse zur Vorbereitung von Luziferase-Aktivitätsmessungen

Die in 3,5 cm-Kulturschalen kultivierten und transfizierten Zellen wurden auf Eis zweimal mit je 1 ml eiskaltem PBS gewaschen und in der Regel in 300 µl Renilla-Luziferase-Lysepuffer vom Boden der Kulturplatte geschabt. Die Zellsuspension wurde für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zelltrümmer bei 4 °C und 13.000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei -80 °C gelagert.

4.2.1.7. Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Vor der Chromatin-IP wurden die verwendeten HeLa B-Zellen nach 4.2.1.3. transfiziert. Zwei Tage nach Zellaussaat wurden die Zellen durch Wechsel des Mediums mit 10 % FCS auf ein 10 % FCS und 1 % Formaldehyd enthaltendes Medium fixiert. Nach zehnminütiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank wurde die Fixierung durch Zugabe von 250 mM Glycin beendet. Die Zellen wurden für weitere fünf Minuten bei Standardbedingungen kultiviert und anschließend 3 x mit kaltem 1 x PBS gewaschen. Nachfolgend wurden die Zellen in 10 ml 1 x PBS mit 0,5 mM EDTA von der Kulturschale gelöst und für fünf Minuten bei 4 °C und 5000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen. Das Zellpellet wurde ggf. bei -80 °C gelagert.

Weiterführend wurden die sedimentierten Zellen in 200 µl RIPA-Puffer nach Zugabe von Inhibitoren (8 mM Na₃VO₄, 2 mM NaF, 80 mM β-Glycerophosphat, 10 µg/ml Leupeptin, 1mM PMSF und 10 µM Pepstatin) resuspendiert und zehn Minuten auf Eis inkubiert. Zum Scheren der Chromatin-Protein-Komplexe wurden die Suspensionen auf Eis mit je 20 Ultraschall-Impulsen (Sonifier 250, Mikrospritze, Stufe 6) behandelt und dieses nach zwei Minuten erneut wiederholt. Nach Zentrifugation bei 4 °C, 15.500 x g für zwanzig Minuten wurde der Überstand abgenommen und weiterverarbeitet. Vor der weiteren Durchführung wurden je 10 µl des Überstandes als Gesamtchromatinkontrolle bei -20 °C gelagert.

Für die spezifische Aufreinigung der Protein-DNA-Komplexe, die NRF-TAP enthielten, wurde eine Inkubation mittels agarosegekoppelter IgG-Antikörper vorgenommen. Hierfür wurden je 50 µl der IgG-Agarose 3 x mit je 1 ml RIPA-Puffer

gewaschen. Anschließend wurden die gewonnenen Überstände mit den agarosegekoppelten IgG-Antikörpern über Nacht bei 4 °C schüttelnd inkubiert. Nach Zentrifugation bei 4 °C und 200 x g für drei Minuten wurden die agarosegekoppelten IgG-Antikörper 2 x mit Puffer A und danach 3 x mit Puffer B und 1 x mit Puffer C gewaschen. Es wurden je 1 ml der entsprechenden Pufferlösungen verwendet. Zwischen den einzelnen Schritten wurde die IgG-Agarose bei 4 °C und 200 x g für drei Minuten abzentrifugiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit je 1 ml TE-Puffer pH 8,0 und zweimaliger Zentrifugation bei 4 °C und 200 x g für drei Minuten wurden die gebundenen Protein-DNA-Komplexe eluiert. Hierzu wurde die IgG-Agarose mit 100 µl TE-Puffer pH 7,4 mit 1 % SDS für zwanzig Minuten schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde die IgG-Agarose für drei Minuten bei 200 x g und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand gesammelt. Die Elution wurde ein weiteres Mal wiederholt. Nachfolgend wurden die vereinten Überstände sowie das Gesamtchromatin mit 10 µl Proteinase K (1 mg/ml) versehen und bei 60 °C über Nacht schüttelnd bei 500 rpm inkubiert. Die nach Proteinverdau in den beiden Probenansätzen vorhandene DNA wurde mit dem Nucleo Spin® Extract II von Macherey-Nagel aufgereinigt. Hierzu wurde nach dem Protokoll der Konzentrierung, Entsalzung und Entfernung von Enzymen (Nr. 7) vorgegangen. Die DNA des Gesamtchromatins wurde mit 2 x 15 µl Elutionspuffer, die für NRF-TAP spezifische DNA wurde mit 2 x 30 µl Elutionspuffer aufgereinigt. Die Eluate wurden im Anschluss für die PCR eingesetzt (s. 4.2.4.10.).

4.2.2. Aufreinigung und Nachweis von Proteinen

4.2.2.1. Aufreinigung von TAP-Fusionsproteinen

Nach einer in 4.2.1.3. beschriebenen Transfektion der entsprechenden Proteine in HeLa B-Zellen und anschließender Zelllyse nach 4.2.1.6. A wurden die NRF-TAP-Proteine nach der Methode der TAP-Fusionsproteinaufreinigung isoliert.

Hierzu wurden 50 µl einer IgG-Agarose-Suspension dreimal mit je 1 ml IPP-150-Puffer äquilibriert. Zwischen den Waschschritten wurde die IgG-Agarose bei 4 °C und 200 x g für drei Minuten abzentrifugiert. Die Kernfraktionen der Zelllysate (s. 4.2.1.6. A) wurden für drei bis vier Stunden bzw. über Nacht bei 4 °C mit der IgG-Agarose

über Kopf schüttelnd inkubiert. Nachfolgend wurden die agarosegekoppelten IgG-Antikörper für drei Minuten bei 4 °C und 200 x g abzentrifugiert und der Überstand ggf. bei -20 °C eingefroren. Die IgG-Agarose wurde erneut 3 x mit je 1 ml IPP-150-Puffer gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurde die IgG-Agarose für drei Minuten bei 200 x g und 4 °C abzentrifugiert. Anschließend wurde die Cytosolfraktion der Zelllysate auf die agarosegekoppelten IgG-Antikörper gegeben und für drei bis vier Stunden bzw. über Nacht über Kopf schüttelnd inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde der Überstand nach Zentrifugation abgenommen und ggf. bei -20 °C eingefroren. Die IgG-Agarose wurde erneut 3 x mit je 1 ml IPP-150-Puffer gewaschen und nach jedem Waschschrift für drei Minuten bei 4 °C und 200 x g abzentrifugiert. Im Anschluss erfolgte ein zweimaliges Waschen mit dem TEV-Spaltungspuffer. Zu dem Puffer wurden 1 mM DTT und 1 µM E64 gegeben. Auch hier wurde die IgG-Agarose nach jedem Waschschrift bei 4 °C und 200 x g für drei Minuten sedimentiert. Nach Zugabe von 140 µl TEV-Spaltungspuffer und 3 µl AcTEV-Protease (30 U) wurde die IgG-Agarose für ein bis zwei Stunden bei Raumtemperatur über Kopf schüttelnd inkubiert. Nach Zentrifugation bei 4 °C und 200 x g für drei Minuten wurde der Überstand mit 50 µl einer Calmodulin-Sepharose-Suspension vereint. Zuvor wurde die Suspension dreimal mit je 1 ml Calmodulin-Bindepuffer gewaschen und nach jedem Waschschrift jeweils für drei Minuten und 200 x g bei 4 °C abzentrifugiert. Anschließend wurde die Suspension für drei bis vier Stunden bzw. über Nacht bei 4 °C über Kopf schüttelnd inkubiert. Hiernach folgte eine Zentrifugation für drei Minuten bei 200 x g und 4 °C. Der Überstand wurde nach Inkubation mit der Calmodulin-Sepharose ggf. bei -20 °C gelagert. Nachfolgend wurde ein viermaliges Waschen mit je 1 ml Calmodulin-Bindepuffer vorgenommen. Zwischen den Waschschriften wurde die Sepharose für drei Minuten und 200 x g bei 4 °C abzentrifugiert. Der Puffer wurde möglichst vollständig abgenommen, die Sepharose-gebundenen Protein-Komplexe in 17 µl 4 x Laemmli-Puffer aufgenommen und für fünf Minuten bei 95 °C aufgeköcht. Anschließend wurden die Proben für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese verwendet (s. 4.2.2.3.).

4.2.2.2. Luziferase-Aktivitätsmessung

Die Messung erfolgte mit dem entsprechenden Assay System (s. 4.1.12.) der Firma Promega. Hiernach wurden 30 µl des Zelllysats (4.2.1.6. B) in einem Kunststoff-

klarsichtröhrchen in das Lumineszenzmessgerät gebracht. Das Gerät injizierte 100 µl substrathaltigen Puffer und detektierte gleichzeitig die Lichtemission für 10 s.

4.2.2.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Es wurde ein SDS-haltiges Acrylamid-Trenngel gegossen aus 0,375 M Tris-HCl pH 8,6, 10% Acrylamid, 4,5% Glycerol, 0,1% SDS, 0,07% APS, 0,17% (v/v) TEMED. Das Gel war etwa 10 cm x 14 cm x 0,2 cm groß. Um eine gerade Trennschicht zu erhalten, wurde vor der Polymerisation 2-Methylpropan-2-ol auf das Gel aufgetragen. Anschließend wurde das 2-Methylpropan-2-ol abgenommen und ein Sammelgel aus 0,125 M Tris-HCl pH 6,8, 4,5% Acrylamid, 0,1% SDS, 0,07% APS, 0,4% (v/v) TEMED auf das auspolymerisierte Trenngel gegossen. Durch Verwendung eines Kammes wurden Probentaschen in das Sammelgel eingebracht.

Anschließend wurden die in Laemmli-Puffer aufgenommenen und für fünf Minuten bei 95 °C inkubierten Proben in die Taschen pipettiert. Es wurde eine Stromstärke von 25 mA pro Gel angelegt. Sobald die Lauffront das Trenngel erreichte, wurde die Stromstärke auf 50 mA pro Gel erhöht. Die Elektrophorese wurde üblicherweise nach 2,5 Stunden beendet.

4.2.2.4. Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf PVDF-Membran (Western Blot) und Detektion der transferierten Proteine

Nach Beendigung des Gellaufs wurde das SDS-Polyacrylamidgel für fünf Minuten in Elektrophoresepuffer A leicht schüttelnd inkubiert. Ebenso wurden je sechs Filterpapierstücke in Elektrophoresepuffer A bzw. K getränkt. Die PVDF-Membran wurde kurz in 100 % Methanol geschwenkt, für fünf Minuten in Wasser geschüttelt und ebenfalls mit Elektrophoresepuffer A inkubiert. Zuvor wurden die PVDF-Membran und die Filterpapiere in der Größe des betreffenden Acrylamidgels ausgeschnitten.

Auf die Kathode wurden die mit Elektrophoresepuffer K getränkten Filterpapiere luftblasenfrei aufgelegt. Nachfolgend wurde das Acrylamidgel mit der Vorderfront nach unten, die PVDF-Membran und schließlich die mit Elektrophoresepuffer A inkubierten Filterpapiere aufgeschichtet und die Luftblasen entfernt. Nach dem Aufbringen der Anode wurde eine Stromstärke von 1 mA pro cm² Gelfläche für eine

Stunde und 20 Minuten angelegt.

Nach dem Transferieren der Proteine von dem SDS-Polyacrylamidgel auf die PVDF-Membran wurde diese 3 x mit TBS-T und nachfolgend 1 x mit TBS gewaschen. Anschließend wurde die Membran für eine Stunde in 5 % (w/v), in TBS gelöstem, Magermilchpulver bei Raumtemperatur geschüttelt. Unspezifische Bindungen wurden so blockiert. Für drei bis vier Stunden bei Raumtemperatur bzw. bei 4 °C über Nacht wurde die Membran in einer Lösung des Primärantikörpers (üblicherweise 1:100 verdünnt in 5 % (w/v) Magermilch in TBS) inkubiert. Da die Primärantikörper mehrmals zur Proteindetektion genutzt wurden, konnten sie durch Zugabe von 0,0025 % (v/v) Mircro-O-Protect konserviert werden.

Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBS-T und einmaligem mit TBS wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper (generell 1:5000 verdünnt in 5 % (w/v) Magermilch in TBS) ebenfalls für drei bis vier Stunden bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei 4 °C geschüttelt.

Die Membran wurde anschließend 3 x mit TBS-T und 1 x mit TBS gewaschen. Sie wurde dann für fünf Minuten mit je 1 ml der Peroxid- bzw. Substratlösungen aus dem „SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate“ oder dem „SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate“ inkubiert. Auf die in Klar-sichtfolie eingeschweißte PVDF-Membran wurde ein Röntgenfilm unter Lichtab-schluss gelegt und dieser nach variabler Zeit entwickelt.

Für die mehrfache Verwendung der PVDF-Membranen mussten die zuvor einge-setzten Antikörper von der Membran entfernt werden.

Ggf. wurde eine ausgetrocknete Membran mit 100 % Methanol für einige Sekunden aktiviert. Nach dem Waschen mit 3 x TBS-T und 1 x TBS wurde die Membran in einem speziellen Puffer („Stripping-Buffer“; s. 4.1.4.) für 25 Minuten bei Raum-temperatur schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden mehrere Waschgänge durch-geführt (3 x mit TBS-T und 1 x mit TBS). Um unspezifische Bindungen zu blockieren, wurde die Membran für eine Stunde in 5 % (w/v) in TBS gelöstem Magermilchpulver bei Raumtemperatur geschüttelt. Die nachfolgende Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörper erfolgte wie oben beschrieben.

Bei Verwendung von unterschiedlichen Antikörpern, die sehr verschieden große Proteine detektierten, konnte der Inkubationsschritt in dem speziellen „Stripping-Buffer“ übersprungen werden. Nach Waschen der PVDF-Membran mit 3 x TBS-T

sowie 1 x TBS wurde diese in 5 % (w/v) gelöstem Magermilchpulver für eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit speziellen Antikörperlösungen.

4.2.3. Arbeiten mit Bakterien (*Escherichia coli*)

4.2.3.1. Kultivierung und Lagerung

Die Bakterien wurden, sofern nicht anders angegeben, in LB-Medium bei 37 °C unter Schütteln kultiviert und ggf. durch Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin selektiert.

Die Lagerung von *Escherichia coli* (*E.coli*)-Bakterien (XL-1-blue) erfolgte in LB-Medium mit 20 % (v/v) Glycerol bei -80°C. Hierfür wurden die Bakterien zunächst in LB-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 bis 0,4 kultiviert und die Bakteriensuspension anschließend mit Glycerol versetzt. Nachfolgend wurde die Suspension in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

4.2.3.2. Transformation

A. Herstellung hitzekompetenter *E. coli*

Hierzu wurde eine Vorkultur von *E. coli* angesetzt. Eine Pipettenspitze der in Glycerol bei -80 °C eingefrorenen Bakterien wurde mit 3 ml LB-Medium versetzt und über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden 100 ml LB-Medium mit dieser Vorkultur (stationäre Phase) beimpft und die Bakterien bis zu einer OD₆₀₀ der Bakteriensuspension von 0,3 bis 0,4 herangezogen. Die Bakterien wurden dann für zehn Minuten bei 2000 x g abzentrifugiert und in 10 ml TSS aufgenommen. Nach zweiminütiger Inkubation auf Eis wurden sie bei -80 °C gelagert.

B. Transformation nach Hitzeschockmethode

Hierfür wurden 200 µl der Suspension hitzekompetenter Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 10 ng DNA oder 4-6 µl des Ligations- (s. 4.2.4.6.) bzw. Mutageneseansatzes (s. 4.2.4.7.) gemischt. Die Bakteriensuspension wurde nun für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien sofort für 45 Sekunden bei 42 °C im

Wasserbad erhitzt und anschließend erneut für zwei Minuten auf Eis gelagert. Die Bakterien wurden in 800 µl LB-Medium ohne Antibiotikum aufgenommen und für eine Stunde bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Je nach Transformationseffizienz wurden 100-800 µl der erhaltenen Bakteriensuspension auf LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin aufgetragen und verteilt. Diese wurde für etwa 16 Stunden bei 37 °C inkubiert.

4.2.4. Arbeiten mit DNA und RNA

4.2.4.1. Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien (*Escherichia coli*)

Sowohl für die Maxi-Präparation als auch die Mini-Präparation wurde das Prinzip der alkalischen Lyse angewandt. Dabei wurde bei der Mini-Präparation die Inkubation auf Eis bzw. bei Raumtemperatur durch mehrmaliges Invertieren ersetzt.

A. Maxi-Präparation

Wie in 4.2.3.2. A beschrieben, wurde eine Vorkultur mit das entsprechende Plasmid enthaltenden *E. coli* angesetzt. Hierzu wurden 3 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin verwendet. Die Vorkultur wurde für 6-8 Stunden bei 37 °C und 200 rpm inkubiert.

Dann wurde, je nach Bakteriendichte, 200-800 µl der Vorkultur in 250 ml LB-Medium (mit 100 µg/ml Ampicillin) überführt. Die Kultur wurde für 16 Stunden bei 37 °C und 160 rpm geschüttelt und anschließend die DNA mit dem Nukleobond PC 500-Paket (Macherey & Nagel) präpariert.

Die Bakterien wurden zunächst bei 4 °C und 2500 x g für 20 Minuten abzentrifugiert und das Pellet in 12 ml Puffer S1 aufgenommen. Durch Zugabe von 12 ml Puffer S2 wurden die Bakterien lysiert. Die Lösung wurde 6-8 x invertiert und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Beendigung der Lyse wurden 12 ml Puffer S3 zugeführt und nach erneutem 6-8maligem Invertieren wurde die Lysatlösung für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Das ausgefallene Präzipitat wurde mit einem Faltenfilter abfiltriert und das klare Lysat auf eine mit 6 ml Puffer N2 äquilibrierte Säule gegeben. Die nicht an die Säule gebundenen, gelösten Bestandteile wurden verworfen und die Säule mit 32 ml Puffer N3 gewaschen. Die DNA wurde nun mit 15 ml Puffer N5 von

der Säule eluiert und durch Zugabe von 11 ml 2-Propanol gefällt. Die Lösung wurde für mindestens 30 Minuten bei 10.000 x g und 4 °C zentrifugiert und das DNA-Pellet mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für zehn Minuten bei 15.000 x g und 4 °C wurde die Ethanol-Lösung abgenommen und die DNA durch Inkubation bei Raumtemperatur getrocknet. Nach vollständigem Verdampfen des Ethanols wurde die DNA in 200 bis 400 µl 10 mM Tris-HCl pH 7,5 aufgenommen. Die Konzentration der gelösten DNA sollte dabei um 2 µg/µl liegen. Bis zu der weiteren Verwendung (z.B. Transfektion; s. 4.2.1.3.) wurden die Nukleinsäuren bei -20 °C gelagert.

B. Mini-Präparation

Hierzu wurde das GFXTM Micro Plasmid Prep Kit (Amersham Biosciences) eingesetzt. Eine Vorkultur aus 3 ml LB-Medium und 100 µg/ml Ampicillin wurde mit *E.coli*-Bakterien nach Transformation (s. 4.2.3.2. B) beimpft und entsprechend 4.2.3.2. A inkubiert. Die DNA wurde aus 1,5 ml Bakterienkultur präpariert.

Die Bakterien wurden zunächst bei maximaler Geschwindigkeit der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Pellet in 150 µl Puffer I resuspendiert. Für die Lyse wurden 150 µl Puffer II zu der Bakteriensuspension gegeben und 10-15 x invertiert. Nach Zugabe von 300 µl Puffer III und erneutem 10-15 x Invertieren wurden die Zelltrümmer bei maximaler Geschwindigkeit für fünf Minuten abzentrifugiert. Für die Aufreinigung der DNA wurde das klare Lysat auf die mitgelieferte Säule gegeben und eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 30 Sekunden Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit wurden die nicht gebundenen, löslichen Bestandteile verworfen und die Säule mit 400 µl des mitgelieferten Waschpuffers gewaschen. Anschließend wurden 45-50 µl 10 mM Tris-HCl pH 7,5 auf die Säule gegeben und für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Die DNA wurde durch einminütige Zentrifugation bei Maximalgeschwindigkeit eluiert. Ggf. konnte der Elutionsschritt zur Erhöhung der Ausbeute wiederholt werden. Die Eluate wurden anschließend vereint.

4.2.4.2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde über eine Extinktionsmessung bei 260 nm bestimmt. Als mittlerer Extinktionskoeffizient wurde 50 g/(l cm) verwendet.

Zur Überprüfung der Reinheit der isolierten Nukleinsäuren wurde der Quotient OD_{260nm}/OD_{280nm} bestimmt. Die DNA konnte als rein betrachtet werden, wenn dieser bei 1,8 oder höher lag.

4.2.4.3. Agarosegelelektrophorese

Die DNA wurde durch Aufnahme in 6 x DNA-Auftragspuffer 1:6 verdünnt. Anschließend wurde sie auf ein Agarosegel (1,2 % (w/v) oder 1,5 % (w/v)) mit Agarose in 1 x TAE, versetzt mit 3 µl Ethidiumbromid-Lösung, geladen. Alternativ wurden 100 ml Agarose, gelöst in 1 x TAE, mit 1,2 µl Ethidiumbromid-Lösung und 150 ml 1 x TAE mit 1,8 µl des Ethidiumbromids versehen. Nachfolgend wurde das Agarosegel mit der DNA versehen. Nach dem Beladen wurde für eine Stunde eine Spannung von 80 V angelegt.

4.2.4.4. Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die mit Ethidiumbromid versetzte DNA wurde zunächst im UV-Licht detektiert und aus dem Gel ausgeschnitten. Die Extraktion der DNA erfolgte mit dem GFX™ DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences). Dabei wurde nach der mitgelieferten Vorschrift verfahren. Das Gelstück wurde zunächst in 1 µl „Capture buffer“ pro mg Gel bei 60 °C für fünf bis 15 Minuten gelöst und dann auf eine mitgelieferte Säule gegeben. Der Puffer wurde für eine Minute bei maximaler Drehzahl der Tischzentrifuge abzentrifugiert und die Säule mit 500 µl Waschpuffer gewaschen. Nach Zentrifugation für eine Minute bei maximaler Geschwindigkeit und Entfernen des Waschpuffers erfolgte zum Trocknen der Säule ein weiterer, zweiminütiger Zentrifugationsschritt. Nachfolgend wurde die DNA 2 x mit je 15 bzw. 25 µl 10 mM Tris-HCl pH 8,0 eluiert und bei -20 °C gelagert.

4.2.4.5. Restriktionsschnitte

A. Analytische Restriktionsschnitte

Für die Identifikation und Kontrolle von Nukleinsäuren wurden analytische Restrik-

tionsschnitte von Plasmid-DNA typischerweise mit etwa 250 ng DNA ausgeführt. Der Verdau erfolgte in der Regel in dem für das betreffende Restriktionsenzym erforderlichen Puffer (s. 4.1.7.). Dabei wurden 10 U Enzym in einem Gesamtvolumen von 10 µl eingesetzt. Die Lösung wurde für minimal eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

B. Präparative Schnitte

Für die Erstellung von Plasmid-DNA wurden präparative Schnitte üblicherweise mit 1 µg DNA und 20 U Enzym in einem Reaktionsvolumen von mindestens 20 µl ausgeführt. Auch hier wurde generell der für das Restriktionsenzym optimierte Puffer (s. 4.1.7.) verwendet. Es wurde für mindestens eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

Das Auffüllen kohäsiver Enden erfolgte mittels Klenow-Fragment. Hierbei handelt es sich um das große Fragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli*.

Nach Restriktionsverdau wurden 15 µl des Ansatzes mit 1 µl dNTP-Mix (1:10 verdünnt), 0,5 µl eines für den Restriktionsschnitt und das Klenow-Fragment passenden Puffers und 5 U Klenow-Fragment auf 20 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Reaktion wurde für 20 Minuten bei 37 °C durchgeführt. Zur Inaktivierung wurde der Ansatz nachfolgend für 15-20 Minuten bei 70 °C inkubiert.

4.2.4.6. Ligation

Um DNA-Fragmente aus zwei verschiedenen Plasmiden miteinander zu verbinden, wurden diese nach Restriktionsverdau ligiert. Hierfür wurden etwa 100 ng DNA eingesetzt, wobei diese für gewöhnlich in einem Verhältnis von 1:4 aus dem eingesetzten Vektor und zusätzlich dem einzufügendem DNA-Fragment bestand. Die DNA wurde in T4-DNA-Ligase-Puffer aufgenommen und mit 1 U T4-DNA-Ligase (Roche) für 16 Stunden bei 16 °C inkubiert. Das Endvolumen des Ansatzes entsprach 10 µl.

Alternativ wurde ein schnelles Ligationsverfahren verwendet. Hierzu wurde eine vergleichbare Menge an DNA in einem 2 x T4-DNA-Ligase-Puffer eingesetzt und mit 3 U der T4-DNA-Ligase (Promega) versehen. Der Reaktionsansatz (10 µl) wurde anschließend bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert.

4.2.4.7. Mutagenese

Die Mutagenese wurde mit dem QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) ausgeführt. Hierfür wurden generell je 125 ng der verwendeten Primer, 100 ng der zu mutierenden DNA, 1 µl dNTP-Mix, 5 µl 10 x Reaktionspuffer und 1 µl *PfuTurbo* DNA-Polymerase (2,5 U) auf ein Gesamtvolumen von 50 µl gebracht. Folgendes Temperaturprogramm wurde als Grundlage verwendet:

	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	95 °C	30 s
2	20	95 °C	30 s
		55-62 °C	60 s
		68 °C	720 s
4	∞	4 °C	

Die Zyklenzahl sowie die Temperatur des Segments zwei konnten variieren.

Nach Beendigung der Mutagenese wurde die verbliebende, methylierte DNA des Originalplasmids durch Zugabe von 10 U des Restriktionsenzym *DpnI* und nachfolgender Inkubation für eine Stunde bei 37 °C verdaut.

4.2.4.8. RNA-Isolierung

Nach Nukleofektion der Zellen entsprechend 4.2.1.5. erfolgte die Isolierung von RNA mittels Trizol/Chloroform-Extraktion. Die kultivierten HeLa B-Zellen wurden dazu zunächst in Kulturmedium abgeschabt. Nach Nachspülen mit kaltem 1 x PBS und Auffüllen eines jeden Ansatzes auf 12 ml Gesamtvolumen mit kaltem 1 x PBS, wurden die Zellen bei 200 x g und 4 °C für zehn Minuten abzentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Zellpellet in 400 µl Trizol-Lösung resuspendiert und für fünf Minuten bei Raumtemperatur auf maximaler Stufe schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden 80 µl Chloroform zugegeben und der Mix für 15 Sekunden durch kräftiges Schütteln durchmischt. Daraufhin wurde für drei Minuten schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde zur Trennung der Phasen fünfzehn Minuten bei 4 °C und 12.000 x g zentrifugiert. Nachfolgend wurde

die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur Fällung der Nukleinsäuren mit 200 µl Isopropanol versetzt. Nach zehn Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die gefällte RNA für weitere zehn Minuten bei 12000 x g und 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde nun mit 75 % (v/v) Ethanol gewaschen und erneut für fünf Minuten bei 7500 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die isolierten Ribonukleinsäuren bei Raumtemperatur für mindestens 30 Minuten getrocknet. Sie wurden abschließend, je nach RNA-Menge, in 30-50 µl Wasser aufgenommen. Zur vollständigen Lösung der RNA wurde für zehn Minuten bei 60 °C inkubiert. Nach Konzentrationsbestimmung (s. 4.2.4.2.) wurde die isolierte RNA ggf. bei -80 °C gelagert.

4.2.4.9. Reverse Transkription (RT)

Vor dem Umschreiben der RNA in cDNA wurde die verbliebende DNA verdaut. Hierfür wurden 3 µg der isolierten RNA in 5 x RT-Puffer aufgenommen und mit 1 U DNase versetzt. Das Reaktionsvolumen betrug 30 µl. Danach wurde für 15 Minuten bei 37 °C und zur Inaktivierung der DNase zehn Minuten bei 70 °C inkubiert. Für die nachfolgende reverse Transkription wurden zwei Drittel der DNase verdauten Lösung eingesetzt, das verbleibende Drittel wurde zur Kontrolle des DNase-Verdaus ohne Zugabe reverser Transkriptase gleich behandelt.

Die reverse Transkription erfolgte mit 20 µg/ml oligo(dT), 10 mM DTT, 40 U RNase-Inhibitor, RT-Puffer und 1 µM ATP-, CTP-, GTP- und TTP-Mix.

Zu dem DNase-Verdauansatz wurden zunächst oligo(dT) und die Nukleotide gegeben und für drei Minuten bei 65°C inkubiert. RNA-Sekundärstrukturen wurden so aufgelöst. Anschließend wurde die Reaktion mit RNase-Inhibitor, DTT, dem 5 x RT-Puffer sowie 200 U reverser Transkriptase angereichert. Das Gesamtvolumen betrug 40 µl je Ansatz bzw. 15,6 µl je Kontrollreaktion. Die reverse Transkription wurde mit folgendem Programm durchgeführt: Zehn Minuten bei 23 °C, 60 Minuten bei 37 °C und abschließend fünf Minuten bei 95 °C. Die Proben wurden ggf. bei -20 °C gelagert.

4.2.4.10. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Um für IL-8, IFN- β und GAPDH spezifische Banden auf der cDNA zu amplifizieren, wurde eine Polymerasekettenreaktion durchgeführt.

Hierfür wurden 400 μ M (für IFN- β) bzw. 200 μ M (für IL-8) dNTP-Mix, 100 pmol der entsprechenden Primer (s. 4.1.8.), PCR-Puffer (mit 2,1 mM MgCl₂), 2,5 U *Taq*-DNA-Polymerase sowie 2,5 μ l aus dem Ansatz der reversen Transkription bzw. 1 μ l aus dem der Kontrolle des DNase-Verdaus eingesetzt. Für die GAPDH-spezifische PCR wurden 3 μ l bzw. 1,2 μ l (Kontrolle) des Ansatzes nach reverser Transkription verwendet. Das Gesamtvolumen der Reaktion betrug 50 μ l. Nach Überschichtung der Proben mit ca. 40 μ l Mineralöl wurde die PCR mit folgendem Programm durchgeführt:

	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	95 °C	300 s
		85 °C	1 s
2	30	95 °C	30 s
		66 °C	45 s
		68 °C	90 s
3	1	60 °C	420 s
4	∞	4 °C	

Für die abschließende Agarosegelelektrophorese (s. 4.2.4.3.) wurden je 10 μ l des PCR-Ansatzes verwendet und die Bandenintensität der amplifizierten PCR-Fragmente durch die Software von Biometra bestimmt.

Nach DNA-Aufreinigung wurden die mittels Chromatin-Immunopräzipitation isolierten Fragmente (s. 4.2.1.7.) über eine PCR analysiert. Promotorbereiche des IFN- β - und IL-8-Gens wurden amplifiziert. Hierfür wurden 1 μ M eines dNTP-Mixes mit PCR-Puffer (Invitrogen), 2 mM MgCl₂, 100 pmol der entsprechenden Primer (s. 4.1.8.) sowie 2,5 U *Taq*-DNA-Polymerase verwendet. Zudem wurden 4 μ l Eluat und 1 μ l aufgereinigtes Gesamtchromatin eingesetzt. Das Volumen des Reaktionsansatzes betrug 50 μ l.

Folgendes PCR-Programm mit variierender Zyklenzahl im Segment zwei wurde gefahren:

	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	94 °C	300 s
2	25-30	94 °C	30 s
		60 °C	30 s
		72 °C	60 s
3	1	72 °C	300 s
4	∞	4 °C	

Je 5 µl des Ansatzes wurden durch Agarosegelelektrophorese (s. 4.2.4.3.) analysiert.

5. Literaturverzeichnis

Agalioti T, Lomvardas S, Parekh B, Yie J, Maniatis T and Thanos D. Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the IFN-beta promoter
3. *Cell* 103: 667-678, 2000.

Agrawal A, Eastman QM and Schatz DG. Transposition mediated by RAG1 and RAG2 and its implications for the evolution of the immune system
1. *Nature* 394: 744-751, 1998.

Ainbinder E, Amir-Zilberstein L, Yamaguchi Y, Handa H and Dikstein R. Elongation inhibition by DRB sensitivity-inducing factor is regulated by the A20 promoter via a novel negative element and NF-kappaB
1. *Mol Cell Biol* 24: 2444-2454, 2004.

Aravind L and Koonin EV. G-patch: a new conserved domain in eukaryotic RNA-processing proteins and type D retroviral polyproteins. *Trends Biochem Sci* 24: 342-344, 1999.

Arenzana-Seisdedos F, Thompson J, Rodriguez MS, Bachelierie F, Thomas D and Hay RT. Inducible nuclear expression of newly synthesized I kappa B alpha negatively regulates DNA-binding and transcriptional activities of NF-kappa B
3. *Mol Cell Biol* 15: 2689-2696, 1995.

Arenzana-Seisdedos F, Turpin P, Rodriguez M, Thomas D, Hay RT, Virelizier JL and Dargemont C. Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NF-kappa B from the nucleus to the cytoplasm
1. *J Cell Sci* 110 (Pt 3): 369-378, 1997.

Bachelierie F, Alcamí J, Arenzana-Seisdedos F and Virelizier JL. HIV enhancer activity perpetuated by NF-kappa B induction on infection of monocytes
3. *Nature* 350: 709-712, 1991.

Blair WS, Bogerd HP, Madore SJ and Cullen BR. Mutational analysis of the transcription activation domain of RelA: identification of a highly synergistic minimal acidic activation module
2. *Mol Cell Biol* 14: 7226-7234, 1994.

Boeger H, Bushnell DA, Davis R, Griesenbeck J, Lorch Y, Strattan JS, Westover KD and Kornberg RD. Structural basis of eukaryotic gene transcription
1. *FEBS Lett* 579: 899-903, 2005.

Bourgeois CF, Kim YK, Churcher MJ, West MJ and Karn J. Spt5 cooperates with human immunodeficiency virus type 1 Tat by preventing premature RNA release at terminator sequences
2. *Mol Cell Biol* 22: 1079-1093, 2002.

Brasier AR, Jamaluddin M, Casola A, Duan W, Shen Q and Garofalo RP. A promoter recruitment mechanism for tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-8 transcription in type II pulmonary epithelial cells. Dependence on nuclear abundance of Rel A, NF-kappaB1, and c-Rel transcription factors. *J Biol Chem* 273: 3551-3561, 1998.

Breathnach R and Chambon P. Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins

3. *Annu Rev Biochem* 50: 349-383, 1981.

Brown K, Park S, Kanno T, Franzoso G and Siebenlist U. Mutual regulation of the transcriptional activator NF-kappa B and its inhibitor, I kappa B-alpha

2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 2532-2536, 1993.

Bucher P. Weight matrix descriptions of four eukaryotic RNA polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences. *J Mol Biol* 212: 563-578, 1990.

Burgess-Beusse B, Farrell C, Gaszner M, Litt M, Mutskov V, Recillas-Targa F, Simpson M, West A and Felsenfeld G. The insulation of genes from external enhancers and silencing chromatin

2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 Suppl 4: 16433-16437, 2002.

Bushnell DA, Westover KD, Davis RE and Kornberg RD. Structural basis of transcription: an RNA polymerase II-TFIIB cocrystal at 4.5 Angstroms

5. *Science* 303: 983-988, 2004.

Butler JE and Kadonaga JT. Enhancer-promoter specificity mediated by DPE or TATA core promoter motifs

2. *Genes Dev* 15: 2515-2519, 2001.

Chen LF and Greene WC. Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5

1: 392-401, 2004.

Choi OR and Engel JD. Developmental regulation of beta-globin gene switching

6. *Cell* 55: 17-26, 1988.

Christmann JL and Dahmus ME. Monoclonal antibody specific for calf thymus RNA polymerases IIO and IIA

1. *J Biol Chem* 256: 11798-11803, 1981.

Chrivia JC, Kwok RP, Lamb N, Hagiwara M, Montminy MR and Goodman RH. Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP

2. *Nature* 365: 855-859, 1993.

Claudio E, Brown K, Park S, Wang H and Siebenlist U. BAFF-induced NEMO-independent processing of NF-kappa B2 in maturing B cells

4. *Nat Immunol* 3: 958-965, 2002.

Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D and Maniatis T. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers

2. *FASEB J* 9: 899-909, 1995.

Conaway JW, Florens L, Sato S, Tomomori-Sato C, Parmely TJ, Yao T, Swanson SK, Banks CA, Washburn MP and Conaway RC. The mammalian Mediator complex

4. *FEBS Lett* 579: 904-908, 2005.

Conaway RC, Kong SE and Conaway JW. TFIIIS and GreB: two like-minded transcription elongation factors with sticky fingers
4. *Cell* 114: 272-274, 2003.

Deng WG, Zhu Y and Wu KK. Up-regulation of p300 binding and p50 acetylation in tumor necrosis factor-alpha-induced cyclooxygenase-2 promoter activation. *J Biol Chem* 278: 4770-4777, 2003.

Deutschman CS. Transcription
6. *Crit Care Med* 33: S400-S403, 2005.

Doly J, Civas A, Navarro S and Uze G. Type I interferons: expression and signalization
1. *Cell Mol Life Sci* 54: 1109-1121, 1998.

Drakas R, Prisco M and Baserga R. A modified tandem affinity purification tag technique for the purification of protein complexes in mammalian cells
3. *Proteomics* 5: 132-137, 2005.

Dreikhausen U, Hiebenthal-Millow K, Bartels M, Resch K and Nourbakhsh M. NF-kappaB-repressing factor inhibits elongation of human immunodeficiency virus type 1 transcription by DRB sensitivity-inducing factor. *Mol Cell Biol* 25
1: 7473-7483, 2005.

Dumont A, Hehner SP, Schmitz ML, Gustafsson JA, Liden J, Okret S, van der Saag PT, Wissink S, van der BB, Herrlich P, Haegeman G, De Bosscher K and Fiers W. Cross-talk between steroids and NF-kappa B: what language?
3. *Trends Biochem Sci* 23: 233-235, 1998.

Eisenberg D, Schwarz E, Komaromy M and Wall R. Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot
1. *J Mol Biol* 179: 125-142, 1984.

Falquet L, Pagni M, Bucher P, Hulo N, Sigrist CJ, Hofmann K and Bairoch A. The PROSITE database, its status in 2002
4. *Nucleic Acids Res* 30: 235-238, 2002.

Feng X, Guo Z, Nourbakhsh M, Hauser H, Ganster R, Shao L and Geller DA. Identification of a negative response element in the human inducible nitric-oxide synthase (hiNOS) promoter: The role of NF-kappa B-repressing factor (NRF) in basal repression of the hiNOS gene
1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99
1: 14212-14217, 2002.

Fish RN and Kane CM. Promoting elongation with transcript cleavage stimulatory factors
2. *Biochim Biophys Acta* 1577: 287-307, 2002.

Fry DC and Vassilev LT. Targeting protein-protein interactions for cancer therapy
2. *J Mol Med* 83: 955-963, 2005.

Fujinaga K, Irwin D, Huang Y, Taube R, Kurosu T and Peterlin BM. Dynamics of human immunodeficiency virus transcription: P-TEFb phosphorylates RD and dissociates negative effectors

from the transactivation response element

1. *Mol Cell Biol* 24: 787-795, 2004.

Furia B, Deng L, Wu K, Baylor S, Kehn K, Li H, Donnelly R, Coleman T and Kashanchi F.

Enhancement of nuclear factor-kappa B acetylation by coactivator p300 and HIV-1 Tat proteins

1. *J Biol Chem* 277: 4973-4980, 2002.

Gallet X, Charlotteaux B, Thomas A and Brasseur R. A fast method to predict protein interaction sites from sequences

3. *J Mol Biol* 302: 917-926, 2000.

Gavin AC, Bosche M, Krause R, Grandi P, Marzioch M, Bauer A, Schultz J, Rick JM, Michon AM, Cruciat CM, Remor M, Hofert C, Schelder M, Brajenovic M, Ruffner H, Merino A, Klein K, Hudak M, Dickson D, Rudi T, Gnau V, Bauch A, Bastuck S, Huhse B, Leutwein C, Heurtier MA, Copley RR, Edelmann A, Querfurth E, Rybin V, Drewes G, Raida M, Bouwmeester T, Bork P, Seraphin B, Kuster B, Neubauer G and Superti-Furga G. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes

1. *Nature* 415: 141-147, 2002.

Ghosh S, May MJ and Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses

1. *Annu Rev Immunol* 16 : 225-260, 1998.

Goodbourn S and Maniatis T. Overlapping positive and negative regulatory domains of the human beta-interferon gene

1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 1447-1451, 1988.

Gossen M and Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 5547-5551, 1992.

Graveley BR. Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world. *Trends Genet* 17: 100-107, 2001.

Green M and Loewenstein PM. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell* 55: 1179-1188, 1988.

Griffin GE, Leung K, Folks TM, Kunkel S and Nabel GJ. Activation of HIV gene expression during monocyte differentiation by induction of NF-kappa B

2. *Nature* 339: 70-73, 1989.

Grishin NV. The R3H motif: a domain that binds single-stranded nucleic acids

1. *Trends Biochem Sci* 23: 329-330, 1998.

Hatada EN, Nieters A, Wulczyn FG, Naumann M, Meyer R, Nucifora G, McKeithan TW and Scheidereit C. The ankyrin repeat domains of the NF-kappa B precursor p105 and the protooncogene bcl-3 act as specific inhibitors of NF-kappa B DNA binding

2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 2489-2493, 1992.

Hayden MS and Ghosh S. Signaling to NF-kappaB

5. *Genes Dev* 18

1: 2195-2224, 2004.

Hearnes JM, Mays DJ, Schavolt KL, Tang L, Jiang X and Pietenpol JA. Chromatin immunoprecipitation-based screen to identify functional genomic binding sites for sequence-specific transactivators

1. *Mol Cell Biol* 25: 10148-10158, 2005.

Heusch M, Lin L, Geleziunas R and Greene WC. The generation of nfkb2 p52: mechanism and efficiency

5. *Oncogene* 18: 6201-6208, 1999.

Hinz M, Loser P, Mathas S, Krappmann D, Dorken B and Scheidereit C. Constitutive NF-kappaB maintains high expression of a characteristic gene network, including CD40, CD86, and a set of antiapoptotic genes in Hodgkin/Reed-Sternberg cells

1. *Blood* 97: 2798-2807, 2001.

Hirano F, Tanaka H, Hirano Y, Hiramoto M, Handa H, Makino I and Scheidereit C. Functional interference of Sp1 and NF-kappaB through the same DNA binding site

1. *Mol Cell Biol* 18: 1266-1274, 1998.

Hiscott J, Alper D, Cohen L, Leblanc JF, Sportza L, Wong A and Xanthoudakis S. Induction of human interferon gene expression is associated with a nuclear factor that interacts with the NF-kappa B site of the human immunodeficiency virus enhancer

1. *J Virol* 63: 2557-2566, 1989.

Huang TT, Kudo N, Yoshida M and Miyamoto S. A nuclear export signal in the N-terminal regulatory domain of IkappaBalpha controls cytoplasmic localization of inactive NF-kappaB/IkappaBalpha complexes

1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 1014-1019, 2000.

Ilag LL, Ilag LM and Ilag LL. From patenting genes to proteins: the search for utility via function.

Trends Biotechnol 20: 197-199, 2002.

Javahery R, Khachi A, Lo K, Zenzie-Gregory B and Smale ST. DNA sequence requirements for transcriptional initiator activity in mammalian cells

1. *Mol Cell Biol* 14: 116-127, 1994.

Jenuwein T and Allis CD. Translating the histone code

1. *Science* 293: 1074-1080, 2001.

Jia S, Flores-Saaib RD and Courey AJ. The Dorsal Rel homology domain plays an active role in transcriptional regulation

1. *Mol Cell Biol* 22: 5089-5099, 2002.

Johnson C, Van Antwerp D and Hope TJ. An N-terminal nuclear export signal is required for the nucleocytoplasmic shuttling of IkappaBalpha

9. *EMBO J* 18: 6682-6693, 1999.

Joliot A, Pernelle C, Deagostini-Bazin H and Prochiantz A. Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis
22. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 1864-1868, 1991.

Kasahara K, Strieter RM, Standiford TJ and Kunkel SL. Adherence in combination with lipopolysaccharide, tumor necrosis factor or interleukin-1 beta potentiates the induction of monocyte-derived interleukin-8
1. *Pathobiology* 61: 57-66, 1993.

Kellum R and Schedl P. A position-effect assay for boundaries of higher order chromosomal domains
2. *Cell* 64: 941-950, 1991.

Kettenberger H, Armache KJ and Cramer P. Architecture of the RNA polymerase II-TFIIS complex and implications for mRNA cleavage
3. *Cell* 114: 347-357, 2003.

Kida Y, Kobayashi M, Suzuki T, Takeshita A, Okamatsu Y, Hanazawa S, Yasui T and Hasegawa K. Interleukin-1 stimulates cytokines, prostaglandin E2 and matrix metalloproteinase-1 production via activation of MAPK/AP-1 and NF-kappaB in human gingival fibroblasts
4. *Cytokine* 29: 159-168, 2005.

Kim RH, Flanders KC, Birkey RS, Anderson LA, Duckett CS, Perkins ND and Roberts AB. SNIP1 inhibits NF-kappa B signaling by competing for its binding to the C/H1 domain of CBP/p300 transcriptional co-activators
1. *J Biol Chem* 276: 46297-46304, 2001.

Kim YK, Bourgeois CF, Pearson R, Tyagi M, West MJ, Wong J, Wu SY, Chiang CM and Karn J. Recruitment of TFIIH to the HIV LTR is a rate-limiting step in the emergence of HIV from latency
1. *EMBO J* 25: 3596-3604, 2006.

Kitajima S, Chibazakura T, Yonaha M and Yasukochi Y. Regulation of the human general transcription initiation factor TFIIF by phosphorylation
3. *J Biol Chem* 269: 29970-29977, 1994.

Knuesel M, Wan Y, Xiao Z, Holinger E, Lowe N, Wang W and Liu X. Identification of novel protein-protein interactions using a versatile mammalian tandem affinity purification expression system
2. *Mol Cell Proteomics* 2: 1225-1233, 2003.

Komarnitsky P, Cho EJ and Buratowski S. Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription. *Genes Dev* 14: 2452-2460, 2000.

Kunsch C and Rosen CA. NF-kappa B subunit-specific regulation of the interleukin-8 promoter
4. *Mol Cell Biol* 13: 6137-6146, 1993.

Kutach AK and Kadonaga JT. The downstream promoter element DPE appears to be as widely used as the TATA box in Drosophila core promoters
1. *Mol Cell Biol* 20: 4754-4764, 2000.

Kwok RP, Lundblad JR, Chrivia JC, Richards JP, Bachinger HP, Brennan RG, Roberts SG, Green MR and Goodman RH. Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB
8. *Nature* 370: 223-226, 1994.

Lenardo MJ, Fan CM, Maniatis T and Baltimore D. The involvement of NF-kappa B in beta-interferon gene regulation reveals its role as widely inducible mediator of signal transduction
1. *Cell* 57: 287-294, 1989.

Levine M and Tjian R. Transcription regulation and animal diversity
1. *Nature* 424: 147-151, 2003.

Lewis JD, Meehan RR, Henzel WJ, Maurer-Fogy I, Jeppesen P, Klein F and Bird A. Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA
2. *Cell* 69: 905-914, 1992.

Lin L and Ghosh S. A glycine-rich region in NF-kappaB p105 functions as a processing signal for the generation of the p50 subunit. *Mol Cell Biol* 16: 2248-2254, 1996.

Lindstrom DL, Squazzo SL, Muster N, Burckin TA, Wachter KC, Emigh CA, McCleery JA, Yates JR, III and Hartzog GA. Dual roles for Spt5 in pre-mRNA processing and transcription elongation revealed by identification of Spt5-associated proteins
1. *Mol Cell Biol* 23: 1368-1378, 2003.

Louie MC, Yang HQ, Ma AH, Xu W, Zou JX, Kung HJ and Chen HW. Androgen-induced recruitment of RNA polymerase II to a nuclear receptor-p160 coactivator complex
2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 2226-2230, 2003.

Lu C, Shen Q, DuPre E, Kim H, Hilsenbeck S and Brown PH. CFos is critical for MCF-7 breast cancer cell growth
2. *Oncogene* 24: 6516-6524, 2005.

Luecke HF and Yamamoto KR. The glucocorticoid receptor blocks P-TEFb recruitment by NfkappaB to effect promoter-specific transcriptional repression
1. *Genes Dev* 19: 1116-1127, 2005.

Magnaghi-Jaulin L, Groisman R, Naguibneva I, Robin P, Lorain S, Le Villain JP, Troalen F, Trouche D and Harel-Bellan A. Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase
3. *Nature* 391: 601-605, 1998.

Matsui K, Fine A, Zhu B, Marshak-Rothstein A and Ju ST. Identification of two NF-kappa B sites in mouse CD95 ligand (Fas ligand) promoter: functional analysis in T cell hybridoma
2. *J Immunol* 161: 3469-3473, 1998.

May MJ, D'Acquisto F, Madge LA, Glockner J, Pober JS and Ghosh S. Selective inhibition of NF-kappaB activation by a peptide that blocks the interaction of NEMO with the IkappaB kinase complex
1. *Science* 289: 1550-1554, 2000.

Merli C, Bergstrom DE, Cygan JA and Blackman RK. Promoter specificity mediates the independent regulation of neighboring genes
1. *Genes Dev* 10: 1260-1270, 1996.

Mogensen TH, Melchjorsen J, Malmgaard L, Casola A and Paludan SR. Suppression of proinflammatory cytokine expression by herpes simplex virus type 1
6. *J Virol* 78: 5883-5890, 2004.

Morris KR, Lutz RD, Choi HS, Kamitani T, Chmura K and Chan ED. Role of the NF-kappaB signaling pathway and kappaB cis-regulatory elements on the IRF-1 and iNOS promoter regions in mycobacterial lipoarabinomannan induction of nitric oxide
1. *Infect Immun* 71: 1442-1452, 2003.

Moynagh PN. The NF-kappaB pathway
4. *J Cell Sci* 118
1: 4589-4592, 2005.

Munshi N, Merika M, Yie J, Senger K, Chen G and Thanos D . Acetylation of HMG I(Y) by CBP turns off IFN beta expression by disrupting the enhanceosome
2. *Mol Cell* 2: 457-467, 1998.

Munshi N, Agalioti T, Lomvardas S, Merika M, Chen G and Thanos D. Coordination of a transcriptional switch by HMGI(Y) acetylation
1. *Science* 293: 1133-1136, 2001.

Muthumani K, Choo AY, Hwang DS, Chattergoon MA, Dayes NN, Zhang D, Lee MD, Duvvuri U and Weiner DB. Mechanism of HIV-1 viral protein R-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 304: 583-592, 2003.

Nabel G and Baltimore D. An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells
4. *Nature* 326: 711-713, 1987.

Narita T, Yamaguchi Y, Yano K, Sugimoto S, Chanarat S, Wada T, Kim DK, Hasegawa J, Omori M, Inukai N, Endoh M, Yamada T and Handa H. Human transcription elongation factor NELF: identification of novel subunits and reconstitution of the functionally active complex
5. *Mol Cell Biol* 23: 1863-1873, 2003.

Niedick I, Froese N, Oumard A, Mueller PP, Nourbakhsh M, Hauser H and Koster M. Nucleolar localization and mobility analysis of the NF-kappaB repressing factor NRF
2. *J Cell Sci* 117: 3447-3458, 2004.

Nisole S and Saib A. Early steps of retrovirus replicative cycle
2. *Retrovirology* 1: 9, 2004.

Nourbakhsh M, Hoffmann K and Hauser H. Interferon-beta promoters contain a DNA element that acts as a position-independent silencer on the NF-kappa B site
2. *EMBO J* 12
1: 451-459, 1993.

Nourbakhsh M and Hauser H. The transcriptional silencer protein NRF: a repressor of NF-kappa B enhancers

1. *Immunobiology* 198
1: 65-72, 1997.

Nourbakhsh M and Hauser H. Constitutive silencing of IFN-beta promoter is mediated by NRF (NF-kappaB-repressing factor), a nuclear inhibitor of NF-kappaB

1. *EMBO J* 18
1: 6415-6425, 1999.

Nourbakhsh M, Oumard A, Schwarzer M and Hauser H. NRF, a nuclear inhibitor of NF-kappaB proteins silencing interferon-beta promoter. *Eur Cytokine Netw* 11

- 1 : 500-501, 2000.

Nourbakhsh M, Kalble S, Dorrie A, Hauser H, Resch K and Kracht M. The NF-kappa b repressing factor is involved in basal repression and interleukin (IL)-1-induced activation of IL-8 transcription by binding to a conserved NF-kappa b-flanking sequence element

1. *J Biol Chem* 276: 4501-4508, 2001.

Ohkuma Y and Roeder RG. Regulation of TFIIF ATPase and kinase activities by TFIIE during active initiation complex formation

5. *Nature* 368: 160-163, 1994.

Orian A, Schwartz AL, Israel A, Whiteside S, Kahana C and Ciechanover A. Structural motifs involved in ubiquitin-mediated processing of the NF-kappaB precursor p105: roles of the glycine-rich region and a downstream ubiquitination domain

3. *Mol Cell Biol* 19: 3664-3673, 1999.

Osborn L, Kunkel S and Nabel GJ. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B

2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 2336-2340, 1989.

Pal M and Luse DS. The initiation-elongation transition: lateral mobility of RNA in RNA polymerase II complexes is greatly reduced at +8/+9 and absent by +23

2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 5700-5705, 2003.

Peng J, Marshall NF and Price DH. Identification of a cyclin subunit required for the function of Drosophila P-TEFb

1. *J Biol Chem* 273: 13855-13860, 1998a.

Peng J, Zhu Y, Milton JT and Price DH. Identification of multiple cyclin subunits of human P-TEFb

1. *Genes Dev* 12: 755-762, 1998b.

Perkins AC, Gaensler KM and Orkin SH. Silencing of human fetal globin expression is impaired in the absence of the adult beta-globin gene activator protein EKLF

4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 12267-12271, 1996.

Perkins ND, Felzien LK, Betts JC, Leung K, Beach DH and Nabel GJ. Regulation of NF-kappaB by cyclin-dependent kinases associated with the p300 coactivator

2. *Science* 275: 523-527, 1997.

Ping YH and Rana TM. DSIF and NELF interact with RNA polymerase II elongation complex and HIV-1 Tat stimulates P-TEFb-mediated phosphorylation of RNA polymerase II and DSIF during transcription elongation

1. *J Biol Chem* 276

1: 12951-12958, 2001.

Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, Wilm M, Mann M and Seraphin B. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration

4. *Nat Biotechnol* 17: 1030-1032, 1999.

Roebuck KA. Regulation of interleukin-8 gene expression. *J Interferon Cytokine Res* 19: 429-438, 1999.

Roeder RG. Transcriptional regulation and the role of diverse coactivators in animal cells

11. *FEBS Lett* 579: 909-915, 2005.

Rondon AG, Gallardo M, Garcia-Rubio M and Aguilera A. Molecular evidence indicating that the yeast PAF complex is required for transcription elongation

1. *EMBO Rep* 5: 47-53, 2004.

Rossignol M, Keriél A, Staub A and Egly JM. Kinase activity and phosphorylation of the largest subunit of TFIIF transcription factor

1. *J Biol Chem* 274: 22387-22392, 1999.

Rothwarf DM and Karin M. The NF-kappa B activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus

2. *Sci STKE* 1999: RE1, 1999.

Schwarze SR, Ho A, Vocero-Akbani A and Dowdy SF. In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse

4. *Science* 285: 1569-1572, 1999.

Schwarze SR and Dowdy SF. In vivo protein transduction: intracellular delivery of biologically active proteins, compounds and DNA

3. *Trends Pharmacol Sci* 21 : 45-48, 2000.

Senftleben U, Cao Y, Xiao G, Greten FR, Krahn G, Bonizzi G, Chen Y, Hu Y, Fong A, Sun SC and Karin M. Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway

1. *Science* 293: 1495-1499, 2001.

Shang Y, Myers M and Brown M. Formation of the androgen receptor transcription complex

1. *Mol Cell* 9: 601-610, 2002.

Shestakova E, Bandu MT, Doly J and Bonnefoy E. Inhibition of histone deacetylation induces constitutive derepression of the beta interferon promoter and confers antiviral activity

1. *J Virol* 75: 3444-3452, 2001.

Shilatifard A, Conaway RC and Conaway JW. The RNA polymerase II elongation complex

5. *Annu Rev Biochem* 72: 693-715, 2003.

Sillerud LO and Larson RS. Design and structure of peptide and peptidomimetic antagonists of protein-protein interaction

2. *Curr Protein Pept Sci* 6 : 151-169, 2005.

Sims RJ, III, Belotserkovskaya R and Reinberg D. Elongation by RNA polymerase II: the short and long of it

2. *Genes Dev* 18: 2437-2468, 2004.

Smale ST and Baltimore D. The "initiator" as a transcription control element

3. *Cell* 57: 103-113, 1989.

Smale ST, Jain A, Kaufmann J, Emami KH, Lo K and Garraway IP. The initiator element: a paradigm for core promoter heterogeneity within metazoan protein-coding genes

1. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 63: 21-31, 1998.

Smale ST and Kadonaga JT. The RNA polymerase II core promoter

1. *Annu Rev Biochem* 72: 449-479, 2003.

Strahl BD and Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature* 403: 41-45, 2000.

Su W, Jackson S, Tjian R and Echols H. DNA looping between sites for transcriptional activation: self-association of DNA-bound Sp1

2. *Genes Dev* 5: 820-826, 1991.

Sun SC, Ganchi PA, Ballard DW and Greene WC. NF-kappa B controls expression of inhibitor I kappa B alpha: evidence for an inducible autoregulatory pathway

4. *Science* 259: 1912-1915, 1993.

Szutorisz H, Dillon N and Tora L. The role of enhancers as centres for general transcription factor recruitment

2. *Trends Biochem Sci* 30: 593-599, 2005.

Takada N, Sanda T, Okamoto H, Yang JP, Asamitsu K, Sarol L, Kimura G, Uranishi H, Tetsuka T and Okamoto T. RelA-associated inhibitor blocks transcription of human immunodeficiency virus type 1 by inhibiting NF-kappaB and Sp1 actions

1. *J Virol* 76: 8019-8030, 2002.

Takada Y, Singh S and Aggarwal BB. Identification of a p65 peptide that selectively inhibits NF-kappa B activation induced by various inflammatory stimuli and its role in down-regulation of NF-kappaB-mediated gene expression and up-regulation of apoptosis. *J Biol Chem* 279: 15096-15104, 2004.

Tanuma S, Yoshimori A and Takasawa R. Genomic drug discovery for apoptosis regulation using a new computer screening amino acid complement wave method

7. *Biol Pharm Bull* 27: 968-973, 2004.

Thanos D and Maniatis T. Virus induction of human IFN beta gene expression requires the assembly of an enhanceosome

5. *Cell* 83: 1091-1100, 1995a.

Thanos D and Maniatis T. Identification of the rel family members required for virus induction of the human beta interferon gene. *Mol Cell Biol* 15: 152-164, 1995b.

Tong Y, Aune T and Boothby M. T-bet antagonizes mSin3a recruitment and transactivates a fully methylated IFN-gamma promoter via a conserved T-box half-site
1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 2034-2039, 2005.

Vermeulen L, De Wilde G, Van Damme P, Vanden Berghe W and Haegeman G. Transcriptional activation of the NF-kappaB p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1)
1. *EMBO J* 22: 1313-1324, 2003.

Vieira KF, Levings PP, Hill MA, Crusselle VJ, Kang SH, Engel JD and Bungert J. Recruitment of transcription complexes to the beta-globin gene locus in vivo and in vitro
2. *J Biol Chem* 279: 50350-50357, 2004.

Villard J. Transcription regulation and human diseases
3. *Swiss Med Wkly* 134: 571-579, 2004.

Wada T, Takagi T, Yamaguchi Y, Ferdous A, Imai T, Hirose S, Sugimoto S, Yano K, Hartzog GA, Winston F, Buratowski S and Handa H. DSIF, a novel transcription elongation factor that regulates RNA polymerase II processivity, is composed of human Spt4 and Spt5 homologs
5. *Genes Dev* 12: 343-356, 1998.

Wu GD, Lai EJ, Huang N and Wen X. Oct-1 and CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) bind to overlapping elements within the interleukin-8 promoter. The role of Oct-1 as a transcriptional repressor
27. *J Biol Chem* 272: 2396-2403, 1997.

Wu Y. HIV-1 gene expression: lessons from provirus and non-integrated DNA
3. *Retrovirology* 1: 13, 2004.

Xiao G, Harhaj EW and Sun SC. NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100
2. *Mol Cell* 7: 401-409, 2001.

Xu X, Prorock C, Ishikawa H, Maldonado E, Ito Y and Gelinas C. Functional interaction of the v-Rel and c-Rel oncoproteins with the TATA-binding protein and association with transcription factor IIB
1. *Mol Cell Biol* 13: 6733-6741, 1993.

Xu D, Tsai CJ and Nussinov R. Hydrogen bonds and salt bridges across protein-protein interfaces
5. *Protein Eng* 10: 999-1012, 1997a.

Xu D, Lin SL and Nussinov R. Protein binding versus protein folding: the role of hydrophilic bridges in protein associations
3. *J Mol Biol* 265: 68-84, 1997b.

Yamaguchi Y, Takagi T, Wada T, Yano K, Furuya A, Sugimoto S, Hasegawa J and Handa H. NELF, a multisubunit complex containing RD, cooperates with DSIF to repress RNA polymerase II elongation
4. *Cell* 97: 41-51, 1999.

Yamaguchi Y, Inukai N, Narita T, Wada T and Handa H. Evidence that negative elongation factor represses transcription elongation through binding to a DRB sensitivity-inducing factor/RNA polymerase II complex and RNA

7. *Mol Cell Biol* 22

1: 2918-2927, 2002.

Yasumoto K, Okamoto S, Mukaida N, Murakami S, Mai M and Matsushima K. Tumor necrosis factor alpha and interferon gamma synergistically induce interleukin 8 production in a human gastric cancer cell line through acting concurrently on AP-1 and NF-kB-like binding sites of the interleukin 8 gene. *J Biol Chem* 267: 22506-22511, 1992.

Yudkovsky N, Ranish JA and Hahn S. A transcription reinitiation intermediate that is stabilized by activator

5. *Nature* 408: 225-229, 2000.

Zhang L, Charron M, Wright WW, Chatterjee B, Song CS, Roy AK and Brown TR. Nuclear factor-kappaB activates transcription of the androgen receptor gene in Sertoli cells isolated from testes of adult rats

3. *Endocrinology* 145: 781-789, 2004.

Zhong H, May MJ, Jimi E and Ghosh S. The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1

5. *Mol Cell* 9: 625-636, 2002.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Myriam Bartels
Wohnort:	Isernhagener Str. 40 30161 Hannover
Geburtstag:	22. 01. 1977
Geburtsort:	Hachmühlen
Staatsangehörigkeit:	Deutsch
Familienstand:	Ledig

Schul Ausbildung

Juli 1983 - August 1987	Grundschule Hachmühlen
Juli 1987 - August 1989	Orientierungsstufe Bad Münder
Juli 1989 - August 1996	Albert-Einstein-Gymnasium Hameln

Hochschulstudium

Oktober 1996 - September 1998	Grundstudium der Biologie an der Universität Hannover
September 1998	Vordiplom
Februar 2003	Abschluss des Studiums nach Fertigstellung der Diplomarbeit mit dem Titel: „Optische Eigenschaften von Hu- manen Hautzellen und Hautge- webe mittels lasergestützter Struk- turcharakterisierung-Untersuchun- gen <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> “
Oktober 2003	Beginn der Anfertigung der Pro- motion am Institut für Pharma- kologie unter Anleitung von PD Dr. Mahtab Nourbakhsh

Liste der Publikationen

Diplomarbeit

Krebs R, Bartels M, Meinhardt M, Lubatschowski H and Anders A. Characterization of optical structures in biological tissue by means of UV-Optoacoustics
5. Laser Phys. 13: 724-730, 2003

Bartels M, Meinhardt M, Krebs R, Petering H, Werfel T and Anders A. Optoacoustics, laserinduced fluorescence (LIF) and photometry for investigation of different skin types *in vitro* and *in vivo*
Proc. Spie 5143: 50-58, 2003

Dissertation

Dreikhausen U, Hiebenthal-Millow K, Bartels M, Resch K and Nourbakhsh M. NF-kappaB-repressing factor inhibits elongation of human immunodeficiency virus type 1 transcription by DRB sensitivity-inducing factor. *Mol Cell Biol* 25
1: 7473-7483, 2005.

Bartels M, Dreikhausen U, Hiebenthal-Millow K, Schweda A, Resch K and Nourbakhsh M. NF-kappaB-repressing factor (NRF) modulates transcription elongation by direct interaction with NF-kappaB Rel homology domain and elongation factor DSIF
Annual Fall Meeting of the Society of biochemistry and molecular biology, Berlin/Potsdam, Page 41 (poster presentation)

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt und nur die angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben. Diese Arbeit wurde bisher nicht an einer anderen Universität oder einem anderen Fachbereich als Dissertation eingereicht. Weiterhin erkläre ich, dass die Dissertation nicht als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit benutzt wurde.

Hannover, den 04.10.2006

(Myriam Bartels)

Danksagung

Ich möchte mich zuerst bei PD Dr. Mahtab Nourbakhsh für die hervorragende Betreuung und die vielen Tipps und Anregungen während meiner gesamten Dissertation bedanken.

Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Prof. Walter Müller für die sofortige Übernahme des Korreferats meiner Arbeit.

Des Weiteren möchte ich Herrn Prof. Resch meinen Dank für die Möglichkeit der Anfertigung meiner Dissertation an dem Institut für Pharmakologie und für seine freundliche Leitung ausdrücken.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung (No 457/2-1 und No 457/2-2).

Mein Dank gilt vor allem auch meinen Mitstreitern. Ich sage ganz herzlich Dank an Birgit und Regina für die stete Hilfe im Labor und für gute Unterhaltungen über alles Mögliche.

Außerdem möchte ich mich bei Sascha und Marc für den wissenschaftlichen und nicht wissenschaftlichen Snack, das Wetten und die wichtigen Tipps bedanken.

Vor allem vielen Dank auch an Aike Schweda für das Austesten der Peptide *in vitro*, für die Reporterexperimente während seiner Diplomarbeit in unserer Arbeitsgruppe und für musikalische Unterredungen.

Zudem möchte ich mich bei Dr. Ursula Dreikhausen für ihre Unterstützung und vielen, hilfreichen Tipps bedanken.

Und hier auch vielen Dank an die Praktikanten, Diplomanten und unseren Zivi Julian für die Hilfe und den vielen Kuchen. Besonders möchte ich hier Rabea für Ihre Klonierungen danken.

Vielen Dank zudem an Aniko Gazdag, die mir eine gute Freundin geworden ist. Auch an Juliane einen großen Dank, ohne deren Einarbeitung ich länger gebraucht hätte, mich zurechtzufinden.

Zum Schluss möchte ich meine Familie, meine Eltern Friedrich und Ingrid, meine Omi Hildegard und meine Schwestern Pamela und Nadine umarmen und Dank sagen für alles! Schön, dass es Euch gibt.

